ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXI, 8. 1978

УДК 576.851.155.095.14

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

А. Д. НАЛБАНДЯН, А. П. АЛЕКСАНЯН

С помощью различных мутагенов (нитрозогуанидин, диметилсульфат, УФ-лучи) получены мутанты клубеньковых бактерий гороха и сои.

В условиях вегетационного опыта установлено, что некоторые полученные мутанты превышают по вирулентности и эффективности исходные штаммы клубеньковых бактерий гороха и сои.

Интерес к проблеме симбиотической биологической фиксации атмосферного азота не снижается в течение ряда десятилетий, и в настоящее время она весьма актуальна. Исключительно важное значение имеют исследования, направленные на изыскание новых эффективных форм клубеньковых бактерий путем их селекции из природы, а также с использованием различных методов экспериментальной изменчивости.

Мутанты клубеньковых бактерий с измененной вирулентностью получены под воздействием радия, тория [1], колхицина [2] и гамма-лучей [3]. Описаны мутанты клубеньковых бактерий люцерны и гороха с измененной специфичностью под воздействием УФ облучения и нитрозометилмочевины [4, 5], а также мутанты с меткой ауксотрофности или устойчивости к антибиотикам, что позволяет производить их отбор на селективных средах [6—9]. По данным некоторых исследователей, мутанты клубеньковых бактерий с повышенной устойчивостью к канамицину, неомицину и биомицину утрачивали эффективность [10, 11], а развитие резистентности к стрептомицину сопровождалось у них потерей вирулентности [12].

В литературе имеются также многочисленные данные, показывающие связь между устойчивостью клубеньковых бактерий к стрептомицину и их эффективностью [13, 14]. Описаны стрептомицин- и канамицинустойчивые, но эффективные мутанты клубеньковых бактерий [15, 16].

Целью нашей работы было получение мутантов клубеньковых бактерий гороха и сои с различной эффективностью под воздействием нитрозогуанидина (НТГ), диметилсульфата (ДМС) и ультрафиолетовых лучей (УФ) с меткой β-глюкозидазной дефицитности.

Материал и методика. Для получения мутантов использовали исходные штаммы клубеньковых бактерий гороха, штамм № 23, выделенный нами, и сои, штамм № 648,

полученный из Ин-та с/х микробиологии. Клубеньковые бактерии гороха обрабатывали супермутагеном НТГ, а сои—УФ и комбинированным способом УФ и ДМС. Указанные химические мутагены готовили в трис буфере, pH 7,0. НТГ использовали в концентрации 1 мг/мл, ДМС—0,2%-ный раствор, а доза УФ составляла 1200 эрг/мм², при длине волны 2555А°. Расстояние между объектом и бактерицидной лампой БУВ-15—25 см.

Клубеньковые бактерии обрабатывали НТГ при экспозициях 10, 20, 30 и 60 мин, ДМС и УФ—15, 30 и 60 мин. Их выращивали в жидкой среде горохового экстракта с 1% сахарозы на качалке (240 об/мин) в течение 18—24 час. при 26°. Клетки клубеньковых бактерий осаждали двукратным центрифугированием при 10000 об/мин в течение 15 мин. Биомассу клеток промывали трис буфером. Суспендированные в трис буфере клетки с первоначальным титром биомассы 15—28 млрд/г в разведениях 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} использовали для обработки мутагенами. Во избежание взаимного экранирования суспензии бактериальных клеток в процессе обработки постоянно перемешивали при 28°. Репликацию обработанных мутагенами клеток клубеньковых бактерий проводили по методу Ледерберга на синтетической среде с 1% глюкозы, сахарозы и салицина.

Эффективность мутагенного действия оценивали по кривым зависимости выживаемости культуры β-глюкозидазной дефицитности и морфологической изменчивости клубеньковых бактерий.

В качестве субстрата для определения β-глюкозидазной активности использовался салицин.

Вирулентность и эффективность мутантных форм клубеньковых бактерий определяли в условиях вегетационного опыта в сосудах с 4 кг стерильного речного песка, обогащенного питательной средой Прянишникова (норма азота 25%). Повторность опыта четырехкратная.

Учет сырого веса надземной и подземной частей растений, количества клубеньков и содержания в них азота производили в фазе бутонизации на 5-ти растениях каждой повторности. Общий азот в надземной части, корнях, и клубеньках растений определяли по методу Къельдаля.

Результаты и обсуждение. При обработке суспензии клеток 18-часовой культуры клубеньковых бактерий гороха в разведении 10^{-3} НТГ в течение 10 мин выживаемость их составляла 85, при экспозиции 20 мин—21, а 30 мин—1,5%, а в разведении 10^{-4} при тех же экспозициях соответственно 36, 16, 1,3%. У 24-часовой культуры, обработанной НТГ, при разведениях 10^{-3}, 10^{-4} выживаемость клеток была выше, чем у 18-часовой. Она понижалась до минимума у 24-часовой культуры при экспозиции 60 мин, а у 18-часовой—при 30 мин (рис. 1). Полученные данные показывают, что у клубеньковых бактерий гороха НТГ индуцирует мутацию в логарифмической фазе, т. е. при выращивании культуры до 18 час.

Выживамость клеток клубеньковых бактерий сои находится в прямой зависимости от времени облучения УФ лучами (рис. 2). Оказалось, что эта культура весьма чувствительна к УФ лучам.

Как видно из рис. 3, выживаемость клеток клубеньковых бактерий сои в разведении 10^{-2} после комбинированной обработки УФ лучами в течение 30 сек и ДМС в течение 30 мин составляет 7,5%, а при обработке в течение 60 мин—5%.

Сравнивая выживаемость клеток клубеньковых бактерий, обработанных УФ в течение 30 сек (15%), с таковыми, обработанными УФ

совместно с ДМС в течение 30 сек и 30 мин (соответственно 7 и 5%), можно заметить, что комбинированное использование мутагенов более эффективно для получения мутантов.

Из полученных 112 мутантов β-глюкозидазной дефицитностью отличались клубеньковые бактерии: гороха—17 (обработка с НТГ), 20—сои (обработка УФ лучами) и 25—сои (комбинированная обработка).

У полученных мутантов отмечались утрата ферментативной активности, изменение формы и величины клеток (рис. 4).

Таблица 1

Вирулентность, активность и эффективность мутантных форм клубеньковых бактерий гороха, вес надземной части, г

Испытанные штаммы	1974		1975		1976		Общий азот, % (средние данные 3-летних испытаний)		
	вес надземной части	количество клубеньков	вес надземной части	количество клубеньков	вес надземной части	количество клубеньков	в надземной части	в корнях	в клубеньках
Исходный штамм	12	328	13	370	15,6	300	1,4	2,0	2,8
М-1	20	600	22	650	19,8	550	3,3	4,3	6,9
М-2	12	420	17	350	16,3	400	0,9	1,8	2,7
М-3	11	460	14	450	14,3	350	2,6	3,3	4,1
М-6	16	400	20	470	16,5	400	2,4	3,0	4,3
М-8	14	600	13	400	16,0	350	1,9	3,3	4,4
М-12	15	400	19	550	17,5	500	2,6	3,8	5,6
М-14	18	600	18	500	15,2	400	2,3	3,4	4,4
Контроль (без инокуляции)	9	—	10	—	9,0	—	0,7	1,2	—

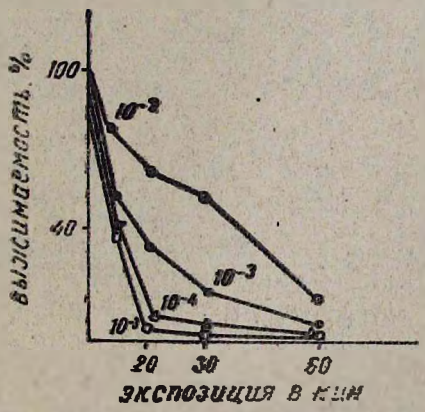

Рис. 1. Действие нитрозогуанидина на выживаемость клеток 24-часовой культуры клубеньковых бактерий гороха.

В табл. 1 представлены данные трехлетних испытаний клубеньковых бактерий гороха. Вес растений контрольного варианта почти в два раза меньше веса растений, инокулированных исходными и му-

тантными штаммами. У большинства растений, инокулированных мутантными штаммами, по сравнению с растениями, инокулированными исходным штаммом, выше урожайность и больше количество клубень-

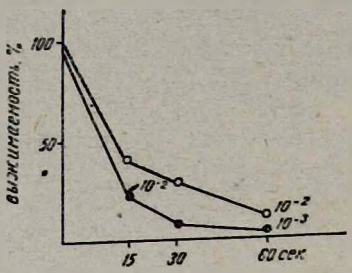

Рис. 2.

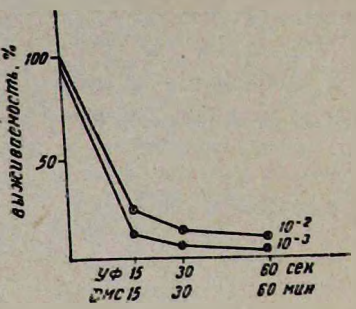

Рис. 3.

Рис. 2. Действие УФ лучей на выживаемость клеток 48-часовой культуры клубеньковых бактерий сои.

Рис. 3. Комбинированное действие УФ лучей и диметилсульфата на выживаемость клеток 48-часовой культуры клубеньковых бактерий сои.

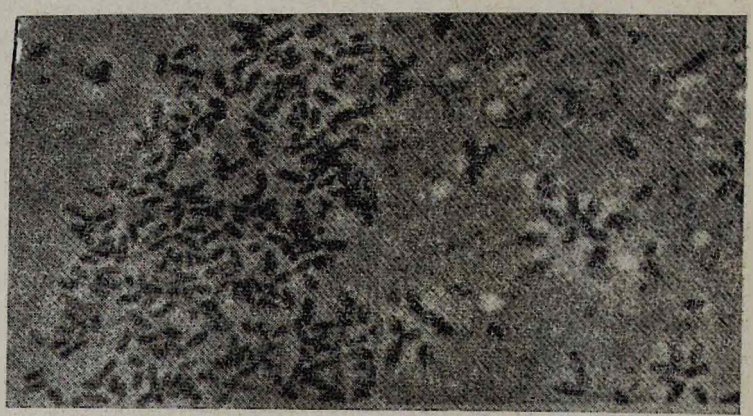

Рис. 4. Форма клеток исходного штамма и мутанта клубеньковых бактерий гороха. а. Исходный штамм 23, б. Мутант М-8.

ков. Так, вес надземной части растений, инокулированных мутантами М-1, М-6, М-8, М-12, М-14 выше, чем у растений, зараженных исходным штаммом. Мутантные штаммы М-2 и М-3, по сравнению с исходным, не повысили урожайность.

Данные вегетационных опытов показали также, что отдельные мутантные формы образуют больше клубеньков, чем исходный штамм. Так, на корнях растений гороха, инокулированных исходным штаммом, образовалось 328 клубеньков, а у растений, зараженных мутантами М-1, М-8 и М-14,—600. Мутантные формы М-1, М-2 и М-14 образовали большие розовые клубеньки, в то время как клубеньки на

корнях растений, зараженных исходным штаммом и мутантами М-2 и М-3, были средних размеров.

Мутантные формы клубеньковых бактерий сои испытывались в течение двух лет (табл. 2, рис. 5). Данные первого года испытаний по-

Таблица 2

Вирулентность, активность и эффективность мутантных форм клубеньковых бактерий сои, вес надземной части, г

Испытанные штаммы	1974		1975		Общий азот, % (средние данные 2-летних испытаний)		
	вес надземной части	количество клубеньков	вес надземной части	количество клубеньков	в надземной части	в корнях	в клубеньках
Исходный штамм № 648	24	65	24	58	2,9	3,1	5,5
УФ-1	39	60	30	90	3,0	3,9	4,9
УФ-14	36	80	32	90	5,1	6,1	8,4
УФ-15	32	80	28	85	4,2	7,2	8,6
УФ-13	26	50	26	60	2,2	3,4	4,9
УФ-4	24	40	24	30	2,8	3,5	5,1
Д-6	38	100	34	85	10,7	12,3	13,0
Д-8	32	70	28	45	4,0	5,5	7,4
Д-12	36	70	34	80	8,1	9,3	11,1
Контроль (без инокуляции)	20	—	23	—	1,5	2,9	—

Рис. 5. Клубеньки на корнях сои, образованные исходным штаммом и мутантом. 1. Контроль (без инокуляции), 2. Исходный штамм 648. 3. Мутант Д-6.

казали, что отдельные мутантные штаммы (УФ-1, УФ-14, УФ-15, Д-6, Д-8, Д-12) более эффективны, чем исходный. Инокулированные этими штаммами растения по количеству клубеньков также превосходят растения, зараженные исходным штаммом. Аналогичные данные были получены в опытах второго года исследования. Только мутанты УФ-4,

УФ-13 и Д-8 как в первом, так и во втором году исследования по количеству образовавшихся клубеньков несколько уступали исходному штамму. Азотфиксирующая активность всех мутантов клубеньковых бактерий гороха, кроме мутанта М-2, была выше, чем у исходного штамма. Высокой азотфиксирующей способностью, по сравнению с исходным штаммом, обладали также все мутанты клубеньковых бактерий сои, за исключением УФ-4 и УФ-13 (табл. 1, 2).

Таким образом, с помощью химических мутагенов и УФ лучей получены многочисленные мутанты клубеньковых бактерий гороха и сои. Испытание их на эффективность в условиях вегетационного опыта показало, что некоторые из них по вирулентности и эффективности превосходят исходные штаммы.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 16.V 1978 г.

ՊԱԼԱՐԱԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ԷՖԵԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Ջ. ՆԱԼԲԱՆԴՅԱՆ, Ա. Պ. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ

Նիտրոզոգուանիդինի, դիմեթիլսուլֆատի և ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցությամբ ստացվել են ոլոռի և սոյայի պալարաբակտերիաների մուտանտներ։ Այդ մուտանտների էֆեկտիվությունը տարիների ընթացքում ուսումնասիրվել է վեգետացիոն փորձի պայմաններում։ Ուսումնասիրությունների արդյունքները ցույց են տվել, որ ստացված մուտանտներից մի քանիսը ցուցաբերել են ավելի բարձր էֆեկտիվություն, քան ելային շտամները։

OBTAINING AND EFFICACY OF NODULE BACTERIA MUTANTS

A. D. NALBANDIAN, A. P. ALEXANIAN

Mutants of nodule bacteria of soybean and pea have been obtained by means of action of nitrosoguanidine, dimethylsulphate and UV-radiations. The efficacy of some mutant cultures of the above-mentioned nodule bacteria has been higher than that of the initial strains.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красильников Н. А., Дробков А. А., Широков О. Г., Шевякова Н. И.* Микроэлементы, Тез. докл. Всес. совещ., Рига, 1955.
2. *Schiel E., Olivero E. L., Diegnez R. N., Pacheco I. C., Enokida E.* Ann. Ints Pasteur, *105*, 322, 1963.
3. *Hamatova E.* Acta Microbiol. Polon., *13*. 247, 1964.
4. *Парийская А. Н.* Микробиология, *37*, 1128, 1968.
5. *Аввакумова Е. Н., Карапетян И. О., Овсепян М. В., Пилосян В. С.* ДАН СССР, *216*, 4, 1974.
6. *Gerson D., Zahler S. A., Alexander M.* Rhiz. Newsletter, 8, 42, 1963.
7. *Schminghamer E. A.* Canad. J. Microbiol., *10*, 221, 1967.

8. *Neuman W.* Molec. Genetics, *102*, 132, 1968.
9. *Баканчикова Т. И., Лобанок Е. В.,* Вестн. Белорус. универ. 2, 1, 1976.
10. *Damery J., Alexander M.* Soil. Sci., *108*, 3, 1969.
11. *Hendry G. S., Jordan D. C.* Canad. J. Microbiol., *15*, 7, 1969.
12. *Zelozna-Kowalska J.* Plant and Soil, Spec., 67, 1971.
13. *Schwinghamer E. A.* Canad. J. Microbiol., *10*, 2, 1964.
14. *Имшенецкий А. А., Парийская А. Н., Эррайс-Лонес Л.* Микробиология, *39*, 343, 1970.
15. *Levin R. A., Montgomery M. P.* Plant and Soil, *41*, 3, 1964.
16. *Amarger N. C.* Acad. Sci. *280*, 16, 1975.