

Е. Н. АВВАКУМОВА, И. О. КАРАПЕТЯН, М. В. ОВСЕПЯН,  
В. С. ПИЛОСЯН

## ИЗМЕНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ У МУТАНТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА

(Представлено академиком М. Х. Чайлаляном 11 II 1974)

Получение мутантов клубеньковых бактерий, кроме практического использования, может быть полезным для изучения природы их специфичности, различий между эффективным и неэффективным симбиозом. Основным признаком специфичности *Rhizobium* является способность образовывать клубеньки на том или ином растении-хозяине. Но использование этого признака для отбора мутантных форм клубеньковых бактерий связано с постановкой трудоемких опытов с растениями. Отбор мутантных форм *Rhizobium* в лабораторных условиях имеет свои трудности из-за отсутствия четких различий между штаммами разных видов, по которым можно было бы выделять мутанты с измененной специфичностью.

В последнее время появились работы, которые дали возможность подойти к отбору мутантных форм с различной способностью к симбиозу. Так, вирулентность и активность штаммов *Rhizobium* связывают с резистентностью к антибиотикам. Мутанты с повышенной устойчивостью к канамицину, неомицину и виомицину теряют свою эффективность<sup>(1, 2)</sup>. При определенном градиенте устойчивости к стрептомицину снижается вирулентность мутантов *Rh. trifolii*<sup>(3)</sup>. По другим данным, устойчивые к стрептомицину мутанты клубеньковых бактерий почти не теряют своей эффективности<sup>(4, 5)</sup>, а иногда даже превосходят исходный штамм<sup>(6)</sup>. Наконец, в появившейся недавно работе сообщается об изменении специфичности у 2 мутантов *Rh. trifolii*, образовавших клубеньки как на клевере, так и на люцерне. Люцерновый же штамм после обработки мутагенами клубеньков на клевере не образовал<sup>(7)</sup>.

В настоящей работе сделана попытка получить мутанты *Rhizobium leguminosarum* с измененной вирулентностью и изучить их специфичность к разным видам бобовых растений, которая является строго разграниченной.

Для отбора и выделения мутантов с измененной специфичностью нами использовалась метка устойчивости к антибиотикам (пенициллину, эритромицину, хлортетрациклину). В качестве исходной культуры был взят предварительно проверенный на устойчивость к антибиотикам штамм *Rh. leguminosarum* № 144, специфичный и активный для гороха. Обработку культуры проводили супермутагеном — нитрозометилмочевинной, которая дает разнообразный спектр изменчивости. Концентрация мутагена 0,2%, время обработки 3 часа, выживаемость культуры при этом составляла 5,2%. Мутанты выделялись со среды с антибиотиками в дозах 20, 50, 100 и 1000 ед на 1 мл среды. По метке устойчивости к антибиотикам было выделено 103 культуры, которые, кроме того, различались по морфологии клеток (форме, размерам и наличию капсулы).

Вирулентность и специфичность выделенных мутантных форм изучалась на бобовых культурах разных видов — горохе, вике, клевере и люцерне. Опыты ставились в стерильных условиях, в колбах, на агаризованной среде Прянишникова с уменьшенной дозой азота. Семена растений перед

## Изменение видовой специфичности мутантных форм клубеньковых бактерий гороха, штамм № 144

Варианты опыта (№ штаммов)	Метка по устойчивости к антибиотикам	Образование клубеньков на растениях					
		горох	вика	клевер	люцерна		
					1-й опыт	2-й опыт	3-й опыт
Без инокуляции	Контроль	—	—	—	—	—	—
Rh. leguminosarum	»	+++	—	—	—	—	—
144 — исходный	»	—	—	—	+++	+++	+++
Rh. trifolii. 21	»	—	—	—	+++	+++	+++
Мутанты							
144—61	Хлортетрациклин 20 ед/мл	—	—	—	+	+	+
144—61, I пассаж						+	+
144—63	То же	—	+	—	+	—	—
144—63, I пассаж						—	—
144—64	» »	—	—	—	+	+	++
144—64, I пассаж		—	—	—	—	+	++
144—64, II пассаж		—	—	—	—	—	—
144—67	» »	—	+	—	+	+	++
144—67, I пассаж						+	—
144—68, I пассаж	Пенициллин 1000 ед/мл	—	—	—	+	+	+
144—70	Эритромицин 20 ед/мл	—	—	—		+	++
144—70, I пассаж						+	+
144—93	То же	—	—	—	+	+	+
144—93, I пассаж		—	—	—		+	+
144—93, II пассаж							
144—94	» »	—	—	+	+	+	+
144—95, I пассаж	» »	—	—	—	+	+	—
144—98	» »	—	—	—	+	+	+

посевом стерилизовались концентрированной серной кислотой 10 мин. и промывались стерильной водой. После посева в колбы семена бактериализовались соответствующей культурой клубеньковых бактерий.

Из всех выделенных культур большая их часть потеряла вирулентность. Вирулентными оказались 25 вариантов, причем некоторые из них изменили свою специфичность (табл. 1). Каждая мутантная форма образовала клубеньки в основном на одном виде бобового растения и лишь немногие — на двух. В работе приведены результаты только по тем формам, которые изменили свою специфичность и образовали клубеньки на люцерне. Клубеньки на люцерне, образованные мутантами горохового штамма, были мелкими и белыми (рис. 1). Эти клубеньки содержали клубеньковые бактерии палочковидной формы и редко бактероиды; клубеньковые бактерии в клубеньках, образованных люцерновым штаммом № 21, крупные, бактероидной формы (рис. 2). Чтобы закрепить приобретенные свойства, клубеньковые бактерии выделялись из клубеньков люцерны, зараженной люцерны, и ими повторно инокулировали растения. Таким образом были выделены культуры I и II пассажей. После пассажа мутантов через люцерну некоторые культуры потеряли вирулентность (№№ 144—63, 144—68), другие, наоборот, — усилили это свойство, образовав более крупные клубеньки и в большем количестве (№ 144—64, II пассаж и № 144—70, I пассаж). Свою способность заражать люцерну

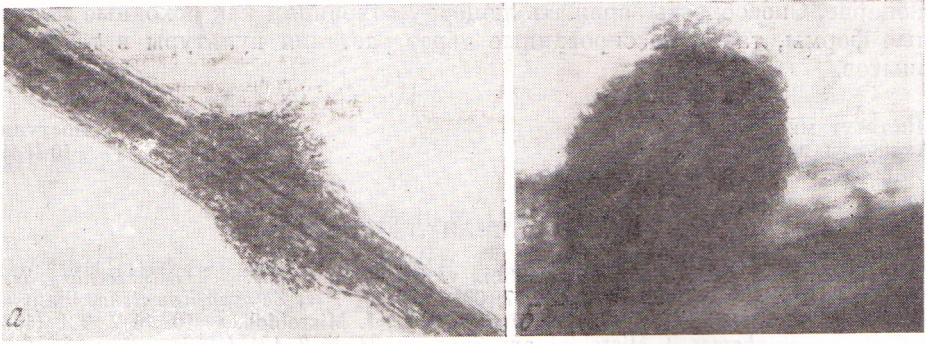


Рис. 1. Клубеньки на корнях люцерны, образованные мутантами №№ 144-61 (а) и 144-64, II пассаж (б), 30×

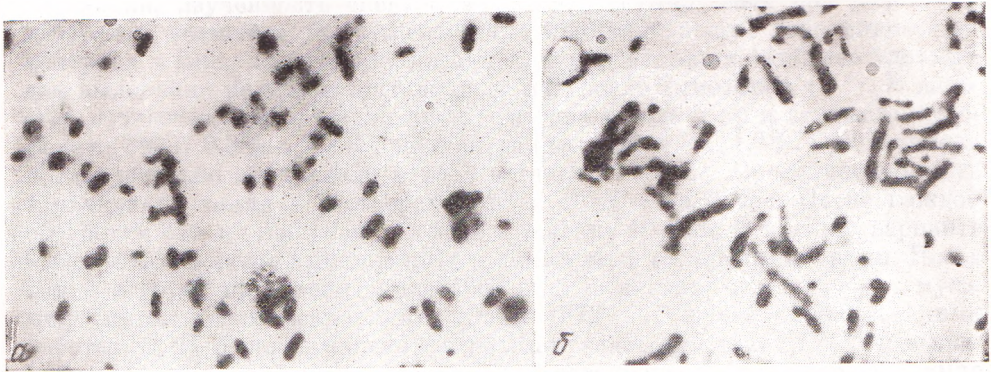


Рис. 2. Клубеньковые бактерии в клубеньках люцерны: а — мутант № 144-64, б — образованы люцерновым штаммом № 21. Окраска кристалл-фиолетовым, 1500×

в течение 3 пассажей сохранили 7 культур, причем клубеньки образовали как исходные мутанты, так и пассированные через растения.

Мутантные формы отличались от исходного штамма № 144 замедленным ростом, более мелкими колониями. После пассажей культур через растения люцерны размер колоний несколько уменьшился, уменьшился и размер клеток. У вариантов, которые потеряли вирулентность к люцерне (№№ 144-68 и 144-95) характер роста очень отличался от остальных культур, образовавших клубеньки. Штамм № 144-68 давал очень обильный рост, а штамм № 144-95, наоборот, имел очень слабый сухой рост и крупные клетки. Хотя четкой связи между культуральными свойствами и вирулентностью не установлено, некоторая тенденция к изменению мутантов в сторону люцерновых культур клубеньковых бактерий наблюдается (более слабый рост, более мелкие колонии и клетки). Определение метки устойчивости к антибиотикам у выделенных из клубеньков культур показало, что пассированные варианты немного повысили свою устойчивость к хлортетрациклину и понизили ее к эритромицину.

Таким образом, с помощью нитрозометилмочевины были получены мутантные формы клубеньковых бактерий гороха с различной устойчивостью к антибиотикам. Изучение специфичности полученных форм к отдельным видам бобовых показало, что 7 культур клубеньковых бактерий гороха изменили свою исходную специфичность, образовав клубеньки на

люцерне. Способность заражать люцерну сохранили как исходные мутантные формы, так и пассированные через растения культуры в течение 3 опытов.

Институт микробиологии  
Академии наук АрмССР  
г. Абовян

Поступило  
10 II 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Y. Damery, M. Alexander, Soil Sci., v. 108, № 3 (1969). <sup>2</sup> G. S. Hendry, D. C. Jordan, Canad. J. Microbiol., v. 15, № 7, 671 (1969). <sup>3</sup> J. Zelazna-Kowalska, Plant and Soil, Spec. v. 67 (1971). <sup>4</sup> E. A. Schwingamer, J. Microbiol., v. 10, № 2, 221 (1964). <sup>5</sup> E. A. Schwingamer, J. Microbiol. and Serol., v. 33, № 2, 121 (1967). <sup>6</sup> А. А. Имишенецкий, А. Н. Парийская, Л. Эррайс Лопес, Микробиология, т. 39, 343 (1970). <sup>7</sup> А. А. Имишенецкий, А. Н. Парийская, Микробиология, т. 42, 343 (1973).