

УДК 576.8:631.46

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Е. Н. АВВАКУМОВА, М. В. ОВСЕПЯН, Т. У. СТЕПАНИН

**НЕКОТОРЫЕ МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ КЛУБЕНЬКОВЫХ
БАКТЕРИЙ ГОРОХА**

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 7 VIII 1975)

Изучение наследственной изменчивости бактерий представляет интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. Наследственная изменчивость тесно связана с ДНК клетки. Увеличение генетического материала в ядре ведет к изменению физиологической и биохимической активности организма.

Появились работы, в которых описываются так называемые полиплоидные формы микроорганизмов, характеризующиеся увеличением количества ДНК в клетке (¹⁻⁴). Полиплоидные формы микроорганизмов в большинстве случаев приобретают новые морфо-физиологические и биохимические качества (⁵⁻⁷).

Сообщение о получении полиплоидных форм у *Rhizobium* в литературе не встречалось. Однако есть указания на возникновения «гигантских» форм *Rhizobium* при совместном их выращивании с *Azotobacter chroococcum* (⁸), но природа возникновения этих форм не выявлена.

В настоящей публикации приводятся сведения по получению и изучению некоторых свойств полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха в чистой культуре и в симбиозе.

Полиплоидные формы клубеньковых бактерий гороха получены с помощью митозных ядов — колхицина, камфоры, аценафтена, а также путем совместного выращивания с азотобактером. Применяли различные дозы и сроки, а также комбинированные обработки митозными ядами. Колхицин применяли в дозах 0,01—1% при сроке обработки от нескольких часов до 30 суток, аценафтен и камфору в виде паров. В качестве исходной культуры использовали местный эффективный штамм клубеньковых бактерий гороха № 123. Отбор полиплоидов проводили из колоний по размерам клеток, по величине и количеству нуклеоидов в клетке путем микроскопирования препаратов, окрашенных по Гимза.

В результате многократного отбора выделены 64 крупноклеточные формы, отдельные из них сохранили свои свойства полиплоидии в течение 3—4 лет.

Полученные полиплоидные формы клубеньковых бактерий гороха отличаются от исходного штамма более крупными клетками (в 1,5—2 раза), увеличенным количеством нуклеоидов (рис. 1). Основным показателем полиплоидии у бактерий является повышенное содержание ДНК в клетках. Определение количества ДНК (по Бартону) у клубеньковых бактерий (табл. 1) показало, что содержание ее на единицу сухой биомассы увеличилось с 1,28% (у исходного штамма № 123) до 2—4% у штамма 123а₆₀ и 123К₃₉. У остальных полиплоидов количество ДНК увеличилось незначительно. При пересчете же ДНК на определенное количество бактериальных клеток (на 1 млрд) выяснилось, что клетки полиплоидных форм содержали ДНК в 2—3 и до 5 раз больше, чем исходный штамм № 123. Таким образом, количество ДНК в клетке указывает на то, что отобранные штаммы отличаются увеличением генетического материала.

Увеличение ДНК в клетках вызвало изменение некоторых морфо-физиологических и цитохимических признаков у полиплоидных штаммов. Полиплоидные штаммы отличались от исходного повышенным количеством крупных клеток в культуре (табл. 1). Так, если количество крупных клеток у исходного штамма № 123 составляло 13,8%, то у полиплоидов 19–56%. Почти все отобранные штаммы пакапливали биомассы на 10–90% больше, чем исходная культура.

Изучение способности усваивать углеводы и органические кислоты выявило изменение этого свойства у отобранных форм. Отдельные поли-

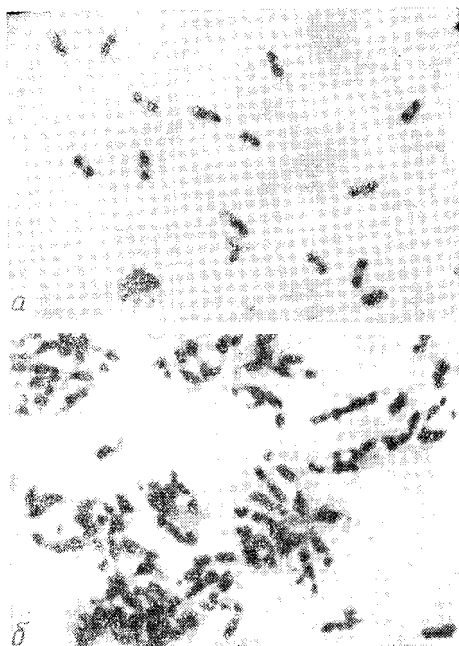
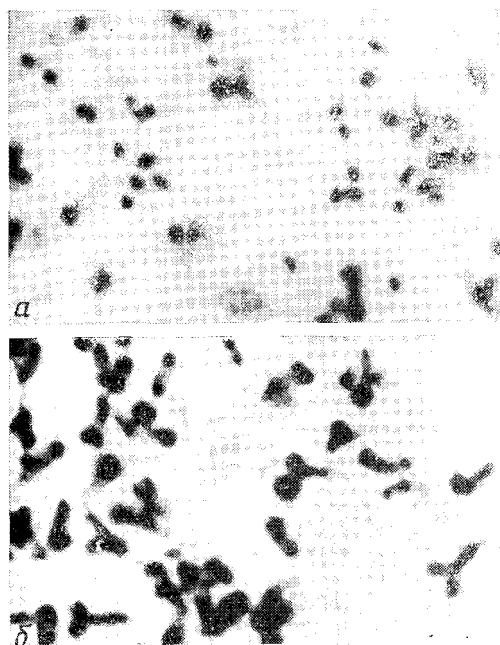


Рис. 1. Исходный и полиплоидный штаммы клубеньковых бактерий гороха. Окраска по Гимза, а – № 123 (исходный), б – № 123аа₁₈ (полиплоидный); 2000 ×

Рис. 2. Клубеньковые бактерии в клубеньках гороха. Окраска по Гимза, а – № 123 (исходный), б – № 123аК₃₁ (полиплоидный); 2000 ×

плоды потеряли или, напротив, приобрели способность усваивать те или иные углеводы и органические кислоты. Способность усваивать углеводы может служить также доказательством изменения штаммов.

Особенности цитологии и цитохимии полиплоидных штаммов показали отличие их от исходного штамма по наличию капсулы, по наличию и локализации полисахаридов и белков в клетке.

Способность к симбиозу и специфичность полученных полиплоидных форм предварительно изучалась в стерильных лабораторных опытах (в колбах на искусственной среде). Все полиплоиды клубеньковых бактерий гороха образовали клубеньки на горохе и многие из них на люцерне, т. е. изменили свою видовую специфичность. Исходный штамм № 123 не образовал клубеньки на люцерне. Дальнейшее уточнение эффективности и специфичности полиплоидных штаммов проводили в вегетационном опыте на стерильном песке. В результате выяснилось, что некоторые измененные полиплоидные формы повысили свою эффективность, увеличив вес растений гороха по сравнению с контролем на 24–58% (табл. 2). Перекрестная инокуляция теми же штаммами люцерны выявила способность всех изученных штаммов образовывать клубеньки на корнях люцерны (другой вид

Таблица 1

Характеристика полиплоидных форм клубеньковых бактерий гороха *

Штаммы	Число нуклеотидов в клетке	Количество ДНК		Число крупных клеток в культуре, %
		% к сухой биомассе	на 1 млрд клеток, мкг	
123 — исходный	1-2	1,28	1,05	13,8
123a — полиплоид	2-3	1,87	2,28	19,2
123a ₆₀ — полиплоид	2-4	2,26	1,98	35,4
123aa ₄₈ — полиплоид	2-4	1,45	2,42	43,7
123aK ₃₁ — полиплоид	2-4	1,39	1,19	51,6
123aK _{9a49} — полиплоид	2-4	1,87	2,69	39,2
123ac ₅₆	1-3	1,50	5,0	56,2
123K ₅₉	2-3	4,04	2,68	26,3

* Индексы у полиплоидных штаммов: а — получен при совместном выращивании с азобактером, К — с помощью колхицина, с — с помощью камфоры.

Таблица 2

Эффективность полиплоидных форм *Rhizobium leguminosarum* в симбиозе с горохом и люцерной (вегетационный опыт)

Штаммы	Горох		Люцерна	
	урожай, %	гликоген в клетках бактерий	урожай, %	гликоген в клетках бактерий
Контроль, без инокуляции	100	—	100	—
123 — исходный	95,2	++	68,8	+++
123a — полиплоид	105,6	++	93,0	++
123a ₆₀ — полиплоид	145,1	±	—	—
123aa ₄₈ — полиплоид	124,0	±	141,0	—
123aK ₃₁ — полиплоид	158,3	±	89,0	+++
123aK _{9a49} — полиплоид	114,5	+++	118,6	++
123ac ₅₆	99,5	+++	100,1	+++
123K ₅₉	105,1	++	121,0	++
21 Rh. meliloti	—	—	154,0	—

Примечание. + наличие гликогена в клетках; ± гликоген присутствовал в единичных клетках; — отсутствие гликогена.

бобового растения). Клубеньки на люцерне при этом были очень мелкие и темные, 1-2 на растение. Из 10 растений на сосуд зараженными оказались 1-2 растения. Исключение составлял штамм № 123aa₄₈, который оказался высоковирулентным как для гороха, так и для люцерны. Этот штамм образовал на корнях люцерны гораздо больше клубеньков, чем остальные и повысил урожай люцерны на 40%. Люцерновый же штамм № 21 дал прибавку урожая на 54%.

Все полиплоидные формы образовали в клубеньках гороха большое количество бактериоидных клеток с крупными нуклеоидами, в отличие от исходного (рис. 2). Таким образом, признаки полиплоидии у отобранных штаммов сохранились и в симбиозе.

В клубеньках люцерны те же полиплоидные штаммы отличались от исходного также более крупными нуклеоидами (рис. 3).

Определение наличия гликогена (табл. 2) в клетках бактерий клубеньков как косвенного показателя эффективности штаммов еще раз подтвердило, что присутствие его в клетках бактерий коррелирует с эффективностью симбиоза (*). Гликоген присутствовал только в клетках тех штаммов, которые оказались неэффективными. Отсутствие гликогена является показателем эффективности штамма, а также отражает его специфичность

к данному растению. Полиплоидный гороховый штамм № 123аа₁₈, образовавший клубеньки на люцерне и повысивший ее урожай не содержал в клетках гликоген. Клетки остальных штаммов в клубеньках люцерны гликоген содержали.

Таким образом, увеличение ДНК в клетках клубеньковых бактерий под действием митозных ядер может привести к достаточно глубоким из-

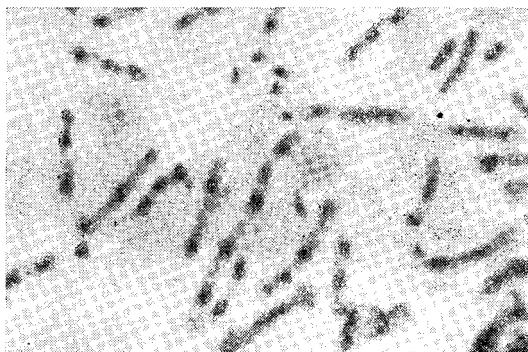


Рис. 3. Полиплоидный штамм № 123аа₁₈ в клубеньках люцерны. Окраска по Гимза, 2000 ×

менениям свойств штамма как в чистой культуре, так и в симбиозе. Метод отбора мутантов по признаку пloidности дает возможность использовать его для получения новых измененных форм с полезными свойствами.

Институт микробиологии
Академии наук АрмССР
г. Абовян

Поступило
5 VIII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Имшенецкий, Л. И. Солнцева, Н. Ф. Куранова, ДАН, т. 152, № 1, 212 (1963). ² Л. С. Попова, Микробиология, т. 35, 3, 448 (1966). ³ А. А. Имшенецкий, Г. К. Жильцова, ДАН, т. 188, № 2, 462 (1969). ⁴ S. Sora, C. Davoli, Atti. Assoc. gen. ital., v. 52 (1969). ⁵ А. А. Имшенецкий, Т. Ф. Кондратьева, Микробиология, т. 37, 5, 784 (1968). ⁶ А. А. Имшенецкий, Т. Ф. Кондратьева, Микробиология, т. 38, 6, 589 (1969). ⁷ А. А. Имшенецкий, Г. К. Жильцова, Микробиология, т. 43, 3, 432 (1974). ⁸ G. Naundorf, R. Nilsson, Naturwiss., B. 31, 29/30, 346 (1943). ⁹ Е. Н. Аввакумова, М. Г. Шамцян и др., Вопр. микробиол., т. 6 (XVI), 62 (1973).