

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

---

На правах рукописи

УДК: 576.851.155 : 576.8.095.312/51

**ФЕДОРОВ**  
Сергей Николаевич

**ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ  
ЛЮЦЕРНЫ С ИЗМЕНЕННЫМИ СИМБИОТИЧЕСКИМИ  
СВОЙСТВАМИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ**

Специальность 03.00.07 — микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД  
1987

Катал.

+

Ф82  
ex7960

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Клубеньковые бактерии (*Rhizobium*), активно фиксирующие атмосферный азот в симбиозе с бобовыми растениями, являются важнейшими для сельскохозяйственного производства микроорганизмами. Внесение под посевы бобовых культур препарата клубеньковых бактерий (ризоторфин) приводит к существенному повышению их урожайности.

Долгое время при отборе штаммов для приготовления ризоторфина использовали методы аналитической селекции. Однако для дальнейшего повышения активности штаммов возникла необходимость применения генетических методов (мутация и гибридизация штаммов). Их использование позволит увеличить изменчивость клубеньковых бактерий, что необходимо для отбора штаммов с повышенной активностью, изучить организацию генетических систем, контролирующих симбиотическую активность ризобий, создав тем самым предпосылки для направленного конструирования хозяйственно-ценных штаммов.

Основой для проведения генетико-селекционной работы с клубеньковыми бактериями являются получение и анализ мутантов, имеющих измененную, в том числе и повышенную симбиотическую активность. Мутанты с повышенной азотфиксирующей активностью были получены у клубеньковых бактерий люцерны, клевера, сои и вишны, однако они не нашли применения в сельскохозяйственной практике, поскольку не обладали высокой конкурентоспособностью и эффективностью в полевых условиях. Систематических исследований по оптимизации условий мутагенеза для получения «симбиотических» мутантов не проводилось. Это ограничило получение мутантов и не позволило успешно вести селекцию штаммов.

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилось получение под действием УФ-излучения мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*R. meliloti*) с измененной симбиотической активностью, необходимых для генетического анализа и селекции этих микроорганизмов. Задачи работы состояли в следующем:

- установить зависимость частоты индукции ауксотрофных и морфологических мутантов клубеньковых бактерий, а также мутантов по симбиозу, от дозы УФ-облучения;
- под действием УФ-излучения получить ауксотрофные, морфологические и фагоустойчивые мутанты для установления связи между типом возникших мутаций и симбиотической активностью мутантов,

Работа выполнена в лаборатории генетики и селекции микроорганизмов Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (г. Ленинград).

Научный руководитель — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник **Б. В. Симаров.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук **В. К. Шильникова**; кандидат биологических наук **Л. Н. Пароменская.**

Ведущее учреждение — биолого-почвенный факультет Ленинградского государственного университета им. А. А. Жданова.

Защита диссертации состоится 27 ноября 1987 г. в \_\_\_\_\_ час. на заседании Специализированного совета (К.020.26.01) по присуждению ученой степени кандидата биологических наук во Всесоюзном научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии по адресу: 188620, г. Ленинград, Пушкин-6, шоссе Подбельского, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан « 27 » октября 1987 г.

А. Н. Зарецкая

а также мутанты с измененными симбиотическими свойствами;

- оценить симбиотические свойства полученных мутантов в стерильных микровегетационных опытах;
- в вегетационных и полевых опытах изучить симбиотические свойства мутантов, показавших в микровегетационных опытах наиболее высокую активность.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые:

- выявлена зависимость частоты возникновения мутантов разных типов, в том числе и мутантов по симбиозу, от дозы УФ-лучей у штамма СХМ1 клубеньковых бактерий люцерны;
- установлено, что у флагоустойчивых и морфологических (бесслизистых и суперслизистых) мутантов штамма СХМ1 с потерей устойчивости к стрептомицину происходит утрата способности фиксировать азот или образовывать клубеньки на корнях люцерны;
- показано, что ступенчатый отбор мутантов, индуцированных УФ-лучами, является эффективным способом селекции высокоактивных штаммов клубеньковых бактерий люцерны;
- установлено, что увеличение урожая люцерны от инокуляции высокоактивными клубеньковыми бактериями коррелирует с конкурентоспособностью использованных мутантных штаммов в условиях полевого опыта.

Практическая ценность. Создана коллекция мутантов *R. meliloti* с измененными культуральными и симбиотическими свойствами (56 ауксотрофных, 36 морфологических, 9 мутантов с измененной устойчивостью к бактериофагам и 44 мутанта с измененной симбиотической активностью). Один штамм успешно прошел, а 2 штамма проходят испытания в Географической сети опытов с нитрагином. На один штамм подана заявка на изобретение (№ 4160605/13) и получено решение о выдаче авторского свидетельства. Научные разработки, относящиеся к получению штаммов с повышенной симбиотической активностью, вошли в 3 оборонки методических рекомендаций по селекции клубеньковых бактерий.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на втором Всесоюзном рабочем совещании по проблемам биологической фиксации азота (Пушино, 1979), на совещании стран-участниц СЭВ по генетике фиксации атмосферного азота (Пушино, 1981), на четвертом и пятом Всесоюзных симпозиумах "Молекулярные механизмы генетических процессов" (Москва, 1979, 1983), на конференциях "Генетика и физиология микроорганизмов - перспективных объектов ген-

ной инженерии" (Пушино, 1984), "Сельскохозяйственная биотехнология" (Москва, 1986), "Взаимодействие микроорганизмов и растений в почве" (ЧССР, 1987). Материалы диссертации вошли в экспозиции, демонстрировавшиеся на ВДНХ СССР в 1985 и 1987 годах. По материалам диссертации опубликованы 13 статей и тезисов.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, раздела "Материалы и методы", глав, содержащих результаты экспериментальной работы, их обсуждение и выводы, и приложения. Работа изложена на 193 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц, 2 рисунка и 4 фотографии. Список литературы содержит 281 наименование, из которых 57 на русском языке.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*). 425a - высокоактивный штамм из коллекции ВНИИСХМ. СХМ1 - стрептомициноустойчивый (1 мг/мл) мутант штамма 425a, полученный А.И. Зарецкой. По азотфиксирующей активности и эффективности он не отличается от родительского штамма. 25-30 получен от М. Ковальского (ПНР). Штаммы являются прототрофными и образуют на агаризованной среде № 79 однородные умеренно слизистые колонии.

Методы. Обработку бактериальной суспензии ( $10^6$ - $10^7$  клеток/мл) УФ-лучами осуществляли при помощи лампы БУВ-30 (мощность излучения 4 Дж/м<sup>2</sup>·сек). Во избежание фотореактивации облучение и посев обработанной суспензии бактерий на питательную среду проводили при темно-красном свете. Выделение и идентификацию ауксотрофных мутантов осуществляли по модифицированному нами методу Холлидея (Симаров, Федоров, 1981). Морфологических мутантов выделяли визуально по степени ослизненности выросших клонов. Для выделения мутантов с измененной устойчивостью к бактериофагам использовали вирулентный фаг Rm16 (соотношение в суспензии фаговых частиц к бактериальным клеткам 10:1). После посева суспензии выросшие клоны тестировали на устойчивость к бактериофагам Rm16, Rm20, Rm1 в слое полужидкой агаризованной (0,7%) среды № 79.

Симбиотические свойства полученных мутантов и клонов, выросших после мутагенеза, изучали в стерильных микровегетационных опытах с люцерной *Medicago sativa* L. сорта Зайкевича (Федоров с соавт., 1986). Азотфиксирующую активность ризобий измеряли с помощью ацетиленового метода, эффективность симбиоза - по сухой зеленой массе растений. Симбиотическую активность мутантов, ото-

бранных по результатам микровегетационных опытов, оценивали также в вегетационных опытах в сосудах с почвой (5 кг). Повторность опытов 8-кратная. Эффективность симбиоза оценивали по сухой зеленой массе люцерны в двух укусах и содержанию в ней общего азота. Эффективность мутантов, имеющих высокие показатели симбиотической активности в вегетационных опытах, определяли в полевых опытах в разных климатических зонах страны (площадь делянок 0,5-6,25 м<sup>2</sup> - при оценке зеленой массы и 64 м<sup>2</sup> - при оценке семенной продуктивности люцерны). Повторность опытов 4-кратная. Инокуляцию семян люцерны проводили ризоторфином, приготовленном на основе испытываемых штаммов. За сезон снимали 1-3 укуса в течение 1-3 лет вегетации растений. Семенную продуктивность люцерны учитывали в год посева. Конкурентоспособность мутантов в вегетационных и полевых опытах определяли по частоте клубеньков, образованных ими на корнях люцерны. Для этого клоны бактерий, выделенные из клубеньков, оценивали на устойчивость к стрептомицину.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами (Доспехов, 1972; Рокицкий, 1973).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### 1. Изучение мутагенного действия УФ-лучей на *Rhizobium* и получение ауксотрофных, морфологических и фагоустойчивых мутантов

Мутагенное действие УФ-лучей на штамм СХМ1 оценивали по частоте возникновения ауксотрофных и морфологических мутантов. Оказалось, что наиболее часто ауксотрофные мутанты возникают при низкой дозе облучения (60 Дж/м<sup>2</sup>), в то время как морфологические мутанты - при высоких дозах (180 - 240 Дж/м<sup>2</sup>).

В результате проделанной работы у штаммов 15-30 и СХМ1 было получено 56 ауксотрофных и 36 морфологических мутантов (табл. I).

Идентификация ауксотрофов показала, что наиболее часто встре-

Таблица I

Получение мутантов под действием УФ-лучей

Исходный штамм	Тип мутантов	Ауксотрофные	Морфологические		Всего	
			бесслизистые	с пониженным слизеобразованием		с повышенным слизеобразованием
15-30		30	6	7	0	43
СХМ1		26	7	9	7	49

чаются мутанты, нуждающиеся в серосодержащих аминокислотах, аргинине и триптофане. Ауксотрофные мутанты штамма СХМ1 сохранили устойчивость к стрептомицину. Все бесслизистые и 4 суперслизистых мутанта этого же штамма утратили стрептомициноустойчивость.

После обработки штамма СХМ1-70 (мутант штамма СХМ1, обладающий повышенной нитрогеназной активностью) УФ-лучами (дозы 60 и 240 Дж/м<sup>2</sup>) и вирулентным бактериофагом Rm16 на фагочувствительность было проанализировано 24 выросших клона. Девять из них имели измененную устойчивость к бактериофагам (табл. 2). В контроле без добавления к облученной суспензии бактерий фага таких клонов обнаружено не было. Три мутанта с приобретением устойчивости к фагам Rm16 и Rm20 изменили свою морфологию и утратили стрептомициноустойчивость. Один мутант (СХМ1-III), устойчивый к фагу Rm16, утратил способность образовывать внеклеточные полисахариды, но сохранил устойчивость к стрептомицину.

Таблица 2

Культуральные свойства мутантов с измененной фагочувствительностью

Получено мутантов	К-во	Из них		
		Gum <sup>-</sup>	Gum <sup>++</sup>	Str-S
устойчивых к фагу Rm16	4	1	0	0
устойчивых к фагам Rm16 и Rm20	3	2	1	3
чувствительных к фагу Rm1	2	0	0	0
$\Sigma$	9	3	1	3

Обозначение: Gum<sup>-</sup> - бесслизистые, Gum<sup>++</sup> - суперслизистые, Str-S - стрептомициночувствительные мутанты.

В отличие от бесслизистых мутантов штамма СХМ1, утративших устойчивость к стрептомицину, СХМ1-III изредка выпячивает слизистые клоны при выращивании на твердой питательной среде. Анализ культуральных свойств 3 ревертантов этого штамма показал, что у них произошло также восстановление исходной фагочувствительности.

##### 2. Оценка симбиотических свойств мутантов с измененными культуральными признаками

Все полученные нами ауксотрофные мутанты сохранили способность образовывать клубеньки на корнях люцерны, однако азотфиксирующая активность у большинства мутантов была снижена или утрачена. При этом четкой зависимости азотфиксирующей активности

мутантов от типа ауксотрофности выявить не удается, поскольку ауксотрофы с одинаковой трофической потребностью могут существенно различаться по активности фиксации азота (табл.3).

Таблица 3

Симбиотическая активность ауксотрофных мутантов штаммов СХМ и L5-30

Ауксотрофность	Проанализировано мутантов	Количество мутантов, у которых азотфиксирующая активность или эффективность			
		не изменена	снижена	утрачена	
метионин	8	7	1	0	
цистеин	3	2	0	1	
метионин или цистеин	1	1	0	0	
триптофан	11	6	5	0	
аргинин	6	3	3	0	
тиамин	3	1	2	0	
гистидин	2	1	1	0	
лейцин	2	0	2	0	
изолейцин + валин	2	0	1	1	
пантотеновая кислота	2	0	1	1	
аденин	2	0	0	2	
аденин + гистидин	1	0	1	0	
аденин + тиамин	1	0	0	1	
глицин	1	0	1	0	
лизин	1	0	1	0	
никотиновая кислота	1	0	0	1	
$\Sigma$	47	21	19	7	

Анализ симбиотических свойств прототрофных ревертантов показал, что у 6 из исследованных ауксотрофных мутантов при реверсии к прототрофности азотфиксирующая активность восстанавливается, т.е. потеря у них активности является следствием мутации ауксотрофности, а у 2 - не восстанавливается и утрата у них способности фиксировать азот является, вероятно, результатом возникновения дополнительных мутаций в генах, контролирурующих функционирование симбиотического аппарата (табл.4). По величине азотфиксирующей активности некоторые прототрофные ревертанты достоверно отличаются от прародительского прототрофного штамма. Возможно, это связано с тем, что у них реверсии к прототрофности произошли за счет супрессорных мутаций, влияющих на азотфиксацию.

Таблица 4

Симбиотические свойства прототрофных ревертантов ауксотрофных мутантов со сниженной или утраченной азотфиксирующей активностью

Мутант	Ауксотрофность	Получено ревертантов	Количество ревертантов, симбиотическая активность которых по отношению к родительскому прототрофному штамму			
			повышена	не изменена	снижена	утрачена
СХМ-11	аденин	5	0	5	0	0
M23	аденин	5	0	0	0	5
M20	гистидин	5	0	5	0	0
СХМ-12	изолейцин + валин	5	2	2	0	1
M17	лейцин	5	0	3	1	1
СХМ-7	никотиновая к-та	2	0	2	0	0
M31	пантотеновая к-та	2	1	1	0	0
СХМ-20	цистеин	3	0	0	0	3
$\Sigma$		32	3	18	1	10

Изучение симбиотических свойств 40 морфологических мутантов, отобранных как непосредственно по изменению морфологии колоний (табл.1), так и по устойчивости к фагу Rm 16 (табл.2), показало, что бесолиственные мутанты как правило лишены способности образовывать клубеньки или фиксировать азот (табл.5). Малоолиственные мутанты сохранили способность фиксировать азот, но большая их часть имеет сниженную активность. У оуперолиственных мутантов наблюдается широкий спектр изменчивости по симбиотической активности. Кроме этого было обнаружено, что все неvirulentные и не фиксирующие азот мутанты штамма СХМ утратили устойчивость к стрептомицину, а мутанты, сохранившие способность к азотфиксации, остались стрептомицинустойчивыми.

Изучение симбиотических свойств 5 мутантов, изменивших фазочувствительность, но сохранивших морфологию родительского штамма (табл.2), показало, что у одного из них симбиотическая активность снижена, а у остальных - не изменена.

Таким образом, для мутантов, утративших способность фиксировать азот, обнаруживается четкая связь между изменениями их симбиотических и культуральных свойств (ауксотрофность, морфология колоний, устойчивость к стрептомицину). Для мутантов же с повышенной азотфиксирующей активностью и эффективностью такой связи выявить не удается. Поэтому в дальнейшем для получения мутантов

