

ЭЛИН ЛОКК, ВЕЛЛО ТОХВЕР

О СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ НЕКОТОРЫХ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ВИКИ И СОИ

Данные о влиянии сильнодействующих факторов на симбиотические свойства клубеньковых бактерий (вирулентность, эффективность симбиоза) в литературе встречаются редко. Наиболее четкие из них получены под влиянием некоторых антибиотиков (Gupta, Kleczowska, 1962; Schwinghamer, 1964 и др.). Что касается таких широкоизвестных мутагенов, как ионизирующие излучения, в частности рентгеновское, то литературные данные об их эффективности в изменении симбиотической активности клубеньковых бактерий крайне немногочисленны. Можно указать лишь на некоторые источники. Так, З. Сарич получил свидетельства того, что γ -лучи в дозе 50 кр стимулируют рост культур клубеньковых бактерий и вместе с тем фиксацию азота в симбиозе. Дозы же выше 150 кр, по его данным, оказались уже летальными (Sarič, 1961).

Возможность повышения симбиотической эффективности клубеньковых бактерий под влиянием рентгеновских лучей доказывают опыты Д. И. Джердана, который отметил, что в случае однократного облучения в дозе 45 кр наблюдается даже изменение неактивных штаммов *Rhizobium meliloti* в активные варианты (Jordan, 1952).

В вышеуказанных источниках не упоминается о связи изменений комплексных симбиотических свойств клубеньковых бактерий с более простыми «одновалентными» изменениями, в частности биохимическими, которые обычно учитываются при генетическом анализе и могут служить критерием для селекционера.

Вышесказанное свидетельствует о необходимости изучения симбиотических свойств выделенных нами мутантных штаммов клубеньковых бактерий, характеризующих дефицитностью по отношению к определенным аминокислотам (Тохвер, Локк, 1968; Lokk, Tohver, 1969). Результаты исследований излагаются в настоящем сообщении.

Материал и методика

В качестве исходного объекта исследований использовались штаммы *Rhizobium leguminosarum* 134 (штамм вики) и *Rh. japonicum* 631 (штамм сои), полученные из коллекции Ленинградского отделения Научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ. Эти штаммы подвергались рентгеновскому облучению в дозе 50 кр и 40 кр соответственно (см. Тохвер, Локк, 1968; Lokk, Tohver, 1969). В 1967—1968 гг. был выделен ряд ауксотрофных по отношению к различным аминокислотам мутантов, возникших в результате облучения. Для проведения настоя-

шей работы выбирались мутантные штаммы 134-4, 134-16, 631-11 и 631-18, отличающиеся устойчивостью мутантных свойств и в то же время удовлетворительными ростовыми свойствами на обычных обогащенных средах. Все эти штаммы проявляли ауксотрофность одновременно по отношению к нескольким аминокислотам (наиболее резко была при этом выражена ауксотрофность по отношению к условной группе «9», см. Lokk, Tohver, 1969).

Симбиотические свойства изученных исходных и мутантных штаммов определялись по вирулентности и симбиотической эффективности. Показателем вирулентности служило число клубеньков на корнях растений при заражении семян, показателем симбиотической эффективности — рост растений (высота надземной части, вес сухой массы надземных частей и корней, накопление в растениях азота, который определяли как общий азот по Кьельдалю).

Опыты проводились в трех сериях: 1) лабораторные опыты в сосудах емкостью 300 см³ с 20 октября по 5 декабря 1967 г.; 2) такие же опыты с 15 июля по 2 сентября 1968 г.; 3) вегетационные опыты во внешних условиях с 3 июля по 9 сентября 1968 г.

Для проведения первого и второго опытов стеклянные сосуды наполнялись мелким щебнем из гранита (величина частиц 5—10 мм), который пропитывался модифицированным питательным раствором Кнопа, в первом случае содержащим 60% азота оригинального состава (0,6 г Ca(NO₃)₂ вместо 1,0 г), а во втором случае вообще без азота. За время опыта уровень питательного раствора сохранялся постоянным.

Первый опыт проводился параллельно в нестерильных и стерильных условиях (нестерильный вариант был проведен для установления эффекта от дополнительного заражения семян), второй — только в стерильных условиях. Контролем в обоих случаях служили незараженные варианты.

Стерилизация посуды, щебня и растворов проводилась в автоклаве, стерилизация семян концентрированной серной кислотой в течение 1,5 мин (Шильникова, 1963).

В сосуды высевались семена, предварительно пророщенные в стерильных чашках Коха на пропитанной водой фильтровальной бумаге при 22°C в течение 3—5 дней.

Культуры клубеньковых бактерий для заражения семян получены путем выращивания музейного инокулята в растворе Кнопа с 60% азота и без азота (для выращивания мутантных культур в среду добавлялись требуемые аминокислоты). Заражение семян проводилось их промачиванием в суспензии бактерий в питательном растворе (густота суспензии $6 \cdot 10^6$ — $8 \cdot 10^6$ клеток/мл). Дополнительное заражение проводилось путем поливки молодых растений такой же суспензией через 10—15 дней после посева (Bürgin-Wolff, 1959; Bowen, 1961; Gibson, 1961; Brockwell, Hely, 1962; Sankaram и др., 1963 и др.). Цитированные авторы не рекомендуют заражения семян, так как токсические выделения оболочек семян могут погубить бактерий.

В каждом варианте насчитывалось 3—5 сосудов, в одном сосуде при этом выращивалось в среднем по три растения. Освещение культур проводили 8 люминесцентными лампами типа ЛБ-30-2 10 ч в сутки, мощность освещения на расстоянии 10 см от растений 240 вт (см. рис. 1).

Первый и второй опыты были завершены в период появления цветов у вики и образования бобов у сои.

Третий опыт проведен только с соей и только в нестерильных условиях в вегетационных сосудах емкостью 30 л, которые заполнялись просеянной через 5-миллиметровое сито дерново-карбонатной типичной почвой pH 7,2—7,4. В опыте было три варианта — незараженный, зараженный исходной культурой *Rh. japonicum* 631 и зараженный мутантной культурой 631-11, каждый проводился в трех повторностях по 10 растений. Семена для посева стерилизовались и подвергались предпосевному проращиванию, как указано выше. Заражение семян и растений проводилось так же, как и в двух первых опытах. Дополнительный полив водой проводился 4 раза за время опыта. Опыт закончен с появлением первых бобов.

При обработке полученных данных вычислены показатели погрешности арифметических средних и средних разниц между вариантами и оценена достоверность последних по обычной методике (Bailey, 1959). Схема опытов дана, в табл. 1.

Таблица 1

Общая схема опытов

Опыт	Растение	Вариант	Стерилизация		Заражение семян	
			сосуда и раствора	семян	исходной культурой	мутантной культурой
I	Вика	1*	—	—	—	—
		2	—	—	+	—
		3	—	—	—	+
	Соя	4*	—	—	—	—
		5	—	—	+	—
		6	—	—	—	+
	Вика	7*	+	+	—	—
		8	+	+	+	—
		9	+	+	—	+
	Соя	10*	+	+	—	—
		11	+	+	+	—
		12	+	+	—	+
II	Вика	13*	+	+	—	—
		14	+	+	+	—
		15	+	+	—	+
	Соя	16*	+	+	—	—
		17	+	+	+	—
		18	+	+	—	+

* Контроль.

Результаты опытов

Результаты опытов изложены в табл. 2, 3 и 4.

Как и следовало ожидать, заражение стерильных семян вики и сои соответствующими культурами клубеньковых бактерий дало значительный положительный эффект (рост растений усиливался на 2—103%, накопление органического азота повышалось на 44—233%). В частности, это наблюдалось у вики, которая имеет более мелкие семена и вместе с тем более ограниченные запасы питательных веществ. Значительный положительный эффект появляется при этом не только в безазотистой среде, но и в среде, где требования молодых растений к азоту должны быть удовлетворены прибавлением минерального азота. Это свидетельствует о многогранном положительном значении симбиоза с клубеньковыми бактериями в жизни растений. Данный вывод подтверждается тем фактом, что закономерный положительный эффект наблюдается и при заражении нестерильных семян в нестерильных условиях роста растений при их снабженности усвояемым азотом как в искусственных гидрокультурах, так и в естественной почве (табл. 2 и 4).

Следует отметить, что особенно четко эффект симбиоза растений с клубеньковыми бактериями по повышению содержания азота проявляется в тканях растений (в том числе и в тех случаях, когда накопление общей биомассы уже не так значительно). Как правило, прирост накопления азота в растениях в результате такого симбиоза выше, чем прирост общей биомассы. Следовательно, дополнительное заражение растений клубеньковыми бактериями приводит не только к общему усиле-

Таблица 2

Результаты первого опыта
(Средние данные на 1 растение)

Растение	Показатели	Стерильные условия				Стерильные условия		
		Нестерильные условия		Дополнительное заражение		Незараженный контроль	Заражение	
		Незараженный контроль	исходной культурой	исходной культурой	мутантной культурой		исходной культурой	мутантной культурой
Вика	Сухой вес, мг	148±7,8	180±16	148±8,6		141±13	193±19	180±23
	Содержание сухого вещества, %	9,74	10,5	10,0		9,66	10,2	11,2
	Азот, мг	5,10±0,12	7,16±0,27	6,00±0,021		4,75±0,25	7,92±0,47	6,85±0,33
	Содержание азота, % от сухого веса	3,45	3,98	4,05		3,37	4,10	3,81
	Количество клубеньков	1±0,36	42±4,7	34±3,7		0	41±3,7	17±2,0
Соя	Сухой вес, мг	258±16	318±21	324±14		119±3,6	201±13	241±23
	Содержание сухого вещества, %	10,7	13,7	13,1		10,4	12,9	12,4
	Азот, мг	6,91±0,42	10,9±0,28	9,58±0,21		2,95±0,088	9,11±0,31	9,83±0,46
	Содержание азота, % от сухого веса	2,68	3,43	2,96		2,48	4,53	4,08
	Количество клубеньков	0	10±1,6	5±0,53		0	4±0,39	3±0,54

Примечание. Растения выращены 20/X—5/XII 1967 г.

на щебневой гидрокультуре в модифицированном растворе Кнопса (0,6 нормы азота). Время:



Рис. 1. Постановка первого и второго опытов.



А

Б

В

Рис. 2. Постановка третьего опыта; *А* — заражен мутантной культурой, *Б* — заражен исходной культурой, *В* — незараженный контроль.

Таблица 3

Результаты второго опыта
(Средние данные на 1 растение)

Растение	Показатели	Незаражен- ный контроль	Заражение	
			исходной культурой	мутантной культурой
Вика	Сухой вес, мг	118±1,9	180±7,7	190±5,6
	Содержание сухого вещества, %	6,17	8,37	8,48
	Азот, мг	2,77±0,098	6,96±0,22	7,15±0,22
	Содержание азота, % от су- хого веса	2,34	3,87	3,76
	Количество клубеньков	0	59±4,7	71±3,1
Соя	Сухой вес, мг	182±9,2	188±12	185±10
	Содержание сухого вещества, %	9,68	12,7	13,5
	Азот, мг	3,60±0,37	7,35±0,58	7,92±0,60
	Содержание азота, % от су- хого веса	1,98	3,91	4,28
	Количество клубеньков	0	6±0,94	7±0,62

Примечание. Растения выращены на шебневой гидрокультуре в модифицированном растворе Кнопа (без азота). Стерильные условия. Время: 15/VII—2/IX 1968 г.

Таблица 4

Результаты третьего опыта
(Средние данные на 1 растение; учтены только надземные части)

Растение	Показатели	Незаражен- ный контроль	Заражение	
			исходной культурой	мутантной культурой
Соя	Сырой вес, мг	10 300±87	12 700±175	13 600±54
	Сухой вес, мг	2080	2810	3190
	Содержание сухого вещества, %	20,2	22,1	23,4
	Азот, мг	46,4±0,46	101±0,16	118±0,37
	Содержание азота, % от су- хого веса	2,23	3,59	3,70
	Высота, см	37,0±0,83	40,5±0,96	45,0±1,41

Примечание. Вегетационный опыт во внешних условиях. Время: 3/VII—9/IX 1968 г.

нию ростовых процессов, но и к качественным изменениям в химическом составе растений.

Наблюдаются некоторые различия в реакции сои и вики на дополнительное заражение клубеньковыми бактериями. Реакция вики особенно сильна в безазотистой среде, что объясняется, как уже сказано, ограниченностью запасных веществ в его семенах по сравнению с

крупными семенами сои. Наоборот, в среде с минеральным азотом соя реагирует более чувствительно.

Сравнение эффекта заражения испытанными мутантными культурами с эффектом заражения исходными культурами не обнаруживает постоянных по направлению сдвигов. Отклонения в обе стороны (повышение или снижение эффективности), как правило, выражаются в разницах, уровень значимости которых не превышает 90%. Только в третьем опыте, который был проведен с соей в естественной почве без стерилизации, были получены данные, свидетельствующие о достоверно повышенной эффективности мутантной культуры 631-11 по сравнению с исходной культурой (уровень значимости разниц по накоплению биомассы и азота растений 95—99%; см. рис. 2).

Что касается вирулентности мутантных культур по сравнению с исходными культурами, то и в этом отношении наблюдалось как повышение, так и снижение, но эти сдвиги обычно не существенны (уровень значимости разниц около 95%). В общем можно сказать, что мутантные культуры были менее вирулентными (67% от всех случаев), но все же отмечен и случай, когда мутантная культура (134-4) показала значительно повышенную вирулентность.

Заслуживает внимания факт выявления положительной корреляции ($r=0,76$, что отвечает уровню значимости 95%) между вирулентностью и эффективностью испытанных мутантных культур. В литературе обычно однозначно не связывают эти показатели.

В заключение можно отметить, что среди ауксотрофных радиомутантов клубеньковых бактерий случайно могут встречаться формы, которые проявляют существенно повышенную симбиотическую эффективность, но однозначной связи между ауксотрофностью и симбиотической эффективностью нами не обнаружено. Последняя как результат сложного комплекса факторов, очевидно, зависит от других признаков и свойств клубеньковых бактерий.

Вывод

Симбиотическая эффективность испытанных мутантов *Rhizobium leguminosarum* и *Rh. japonicum* не находится в однозначной зависимости от ауксотрофности по отношению к аминокислотам. Ауксотрофность к аминокислотам нельзя считать критерием сложного явления симбиотической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

- Тохвер В., Локк Э., 1968. О появлении дефицитности к аминокислотам у клубеньковых бактерий под влиянием рентгеновских лучей. Изв. АН ЭССР. Биол. 17 (4) : 374—381.
- Шильникова В. К., 1963. Исследование азотного состава бактеризованных растений и изоэлектрической точки клубеньковой ткани как возможных критериев эффективности азотфиксирующих бактерий. Автореф. дисс. канд. биол. н. Москва.
- Bailey N. T. J., 1959. Statistical Methods in Biology. London.
- Bowen G. D., 1961. The toxicity of legume seed diffusates toward rhizobia and other bacteria. Plant and Soil 15 (2) : 155—165.
- Brockwell J., Hely F. W., 1962. Relationship between viability and availability of *Rhizobium trifolii* introduced into seeds of *Trifolium subterraneum* L. by imbibition and pressure. Aust. J. Agric. Res. 13 (6) : 1041—1053.
- Bürgin-Wolff A., 1959. Untersuchungen über die Infektion von Wurzeln durch Knöllchenbakterien. Berl. Schweizer. Bot. Ges. (69) : 75—111.
- Gibson A. H., 1961. Root temperature and symbiotic nitrogen fixation. Nature 191 : (4793) : 1080—1081.

- Gupta B. B., Kleczowska J., 1962. A study of some mutations in a strain of *Rhizobium trifolii*. J. Gen. Microbiol. 27 (3) : 473—476.
- Jordan D. I., 1952. Studies on the legume root nodule bacteria. II. The production and behaviour of colonial mutants produced by X-ray irradiation. Canad. J. Bot. 30 (2).
- Lokk E., Tohver V., 1969. Mõgarbakteritel röntgenikiirte toimetel tekkivast biokeemilist defitsiitsusest. ENSV TA Toimet., Biol. 18 (3) : 276—281.
- Sankaram A., Raju P. V. L. N., Kasariah S., 1963. Effect of phosphate on nitrogen fixing power of root nodule bacteria. Sci. and Culture 29 (8) : 406—407.
- Sarič Z., 1961. Uticaj srednjih i visokih doza gama-zraka na neke sojeve *Rhizobium* sp. Летоп. научн. радова (5) : 146—154.
- Schwinghamer E. A., 1964. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* sp. Can. J. Microbiol. 10 (2) : 221—233.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
27/X 1970

Тартуский государственный университет

ELIN LOKK, VELLO TOHVER

VIKI JA SOJA MÜGARBAKTERITE MÕNEDE AUKSOTROOFSETE MUTANTIDE SÜMBIOOTILISTEST OMADUSTEST

Resümee

Uuriti *Rhizobium leguminosarum*'i 134 (vikk) ja *Rh. japonicum*'i 631 (soja) röntgenikiirtega indutseeritud aminohappeauksotroofsete mutantide virulentsust ja sümbiootilist efektiivsust. Nende biokeemilise defitsiitsuse näitajate ning sümbioosi efektiivsuse vahel, mis määrati mügarate moodustumise, peremeestaimede kasvu ja lämmastiku akumulermise intensiivsuse järgi, ei avastatud selget seost. Mutanttüved erinesid lähtetüvedest nii madalama kui ka kõrgema efektiivsuse suunas, kuid ebaolulisel määral. Ainult ühel juhul oli mutanttüvi (*Rh. leguminosarum*, 134—4) tunduvalt efektiivsem.

Sümbiootiline efektiivsus on mügarbakterite kompleksne omadus, mille kriteeriumina ei saa kasutada mutantsust iseloomustavaid üksiktunnuseid.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalsooia Instituut

Toimetusse saabunud
27. X 1970

Tartu Riiklik Ülikool

ELIN LOKK, VELLO TOHVER

ON THE SYMBIOTIC EFFICIENCY OF AMINO ACID AUXOTROPHIC MUTANTS OF THE VETCH AND SOYBEAN ROOT NODULE BACTERIA

Summary

The virulence and symbiotic efficiency of amino acid auxotrophic mutants was investigated in *Rhizobium leguminosarum* 134 (vetch) and *Rh. japonicum* 631 (soya), the mutants having been induced by X-ray irradiation. No clear dependence between the indicators of biochemical deficiency and efficiency of symbiosis could be found if the latter was determined according to the number of root nodules and intensity of plant growth and nitrogen accumulation. As a rule, the mutant strains showed only inessential differences of efficiency in comparison with the original ones. Only one mutant strain (*Rh. leguminosarum*, 134—4) was found to be substantially more efficient.

The symbiotic efficiency of the leguminous root nodule bacteria is a complex property which cannot be determined by simple biochemical deficiencies.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology
Tartu State University

Received
Oct. 27, 1970