

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 - стрептомицинустойчивый (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 - стрептомицинчувствительные 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, контролирующих 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 Rm16 (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 стрептомицину устойчивыми.

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

с измененными симбиотическими свойствами мы использовали тотальный анализ клонов, выросших после мутагенеза.

Таблица 5

Симбиотические овойства мутантов по экскреции полисахаридов

Штамм	Тип мутанта	Nod <sup>-</sup>	Eff <sup>-</sup>	Eff <sup>±</sup>	Eff <sup>+</sup>	Eff <sup>++</sup>
L 5-30	Gum <sup>-</sup>	0	6	0	0	0
	Gum <sup>±</sup>	0	0	4	3	0
СХМ1	Gum <sup>-</sup>	2	7	0	1	0
	Gum <sup>±</sup>	0	0	6	3	0
	Gum <sup>++</sup>	2	3	0	1	2
Σ		4	16	10	8	2

Примечание. Цифры указывают количество полученных мутантов: Gum<sup>-</sup> - бесслизистых, Gum<sup>±</sup> - малослизистых, Gum<sup>++</sup> - суперслизистых, Nod<sup>-</sup> - нефиксирующие, Eff<sup>-</sup> - неэффективных, Eff<sup>±</sup> - слабоэффективных, Eff<sup>+</sup> - эффективных, Eff<sup>++</sup> - с повышенной эффективностью.

### 3. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами

Для получения мутантов мы использовали 2 дозы (60, 240 Дж/м<sup>2</sup>) УФ-лучей, различающиеся по мутагенному действию. Отбор мутантов проводили в 2 этапа. На первом этапе свойства клонов, выросших после обработки мутагеном и не отличающиеся по культуральным свойствам от родительского штамма СХМ1, оценивали в микроvegetационных опытах с 2-кратной повторностью. На втором этапе симбиотические свойства клонов, отличающиеся от родительского штамма по редукции ацетилену не менее, чем на 30 %, а по эффективности на 15 %, оценивали в опытах с 6-кратной повторностью.

В результате анализа симбиотических свойств 900 клонов, выросших после облучения, было выделено 23 мутанта с измененными симбиотическими свойствами (табл.6). Среди них имеются мутанты, утратившие способность образовывать клубеньки или фиксировать азот в симбиозе с люцерной, а также обладающие пониженной и повышенной азотфиксирующей активностью или эффективностью. Один мутант обладал повышенной азотфиксирующей активностью и эффективностью одновременно. Среди 200 клонов, выросших из необлученной суспензии, мутантов обнаружено не было.

Можно видеть (табл.6), что нефиксирующие и нефиксирующие му-

Таблица 6

Зависимость частоты возникновения мутантов по симбиозу у штамма СХМ1 от дозы УФ-лучей

Доза облучения (Дж/м <sup>2</sup> )	Проанализировано клонов	Получено мутантов		Частота возникновения мутантов, %		
		Nod <sup>-</sup> , Fix <sup>-</sup>	Fix <sup>+</sup> , Eff <sup>±</sup> , Eff <sup>++</sup>	Nod <sup>-</sup> , Fix <sup>-</sup>	остальных	суммарная
0	200	0	0	0	0	0
60	400	1	10	0,3±0,3	2,5±0,4	2,8±0,8
240	500	7	5	1,4±0,5	1,0±0,5	2,4±0,7
Σ	900	8	15	0,9±0,3	1,7±0,4	2,6±0,8

Примечание. Обозначены мутанты: Nod<sup>-</sup> - нефиксирующие, Fix<sup>-</sup> - нефиксирующие азот, Fix<sup>+</sup> - с пониженной и Fix<sup>++</sup> - с повышенной азотфиксирующей активностью. Такой же принцип обозначения использован и для мутантов по эффективности (Eff).

танты возникают с достоверно большей частотой при облучении дозой 240 Дж/м<sup>2</sup>, тогда как мутанты с количественным изменением симбиотической активности возникают преимущественно при низкой дозе (60 Дж/м<sup>2</sup>) УФ-лучей.

Для получения мутантов с более высокой симбиотической активностью мы использовали ступенчатый отбор. Мутагенез проводили на мутантах штамма СХМ1 первой степени отбора. Это мутант СХМ1-70 с повышенной (в 1,5 раза) нитрогеназной активностью и мутанты СХМ1-96 и СХМ1-97, характеризующиеся повышенной (на 12-13 %) эффективностью по сравнению с родительским штаммом.

В результате повторной обработки штаммов УФ-излучением (доза 60 Дж/м<sup>2</sup>) и анализа симбиотических свойств 186 клонов у каждого родительского штамма было получено по одному мутанту с повышенной эффективностью. Среди 15 клонов штамма СХМ1-70, выделенных после воздействия на обработанную УФ-лучами бактериальную суспензию фагом Rm 16 и сохранивших фаготип исходного штамма, 6 имели повышенную эффективность (на 10-20 %) по сравнению с родительским штаммом (табл.7). Из трех спонтанных олизистых ревертантов штамма СХМ1-III (бесслизистый фагоустойчивый мутант штамма СХМ1-70, см. разд.1) два проявили повышенную эффективность в микроvegetационном опыте (третий ревертант утратил способность фиксировать азот).

В микроvegetационных опытах (табл.7) все мутанты штамма СХМІ-70 с повышенной эффективностью имели более низкую ацетилгидроксиацетиленовую активность, чем родительский штамм, но более высокую, чем исходный штамм СХМІ (статистически достоверно для всей группы полученных мутантов при  $P < 0,05$ ).

Таблица 7

Симбиотические свойства мутантов, выделенных после обработки штамма СХМІ-70 УФ-лучами и фагом Rm I6

Мутант	Относительные к показателям штамма СХМІ	
	редукция ацетилена	сухая масса растений
СХМІ	1,00	1,00
СХМІ-70	1,50	1,00
СХМІ-103	1,08	1,10
СХМІ-102	1,11	1,10
СХМІ-104	1,33	1,13
СХМІ-110	1,38	1,13
СХМІ-105	1,41	1,15
СХМІ-109	1,09	1,20
СХМІ-215 (R3MІ-III)	1,25	1,13
СХМІ-214 (R2MІ-III)	1,30	1,15
СХМІ-216 (R1MІ-III)	0	0,52

#### 4. Изучение симбиотических свойств мутантов в вегетационных опытах

Для того, чтобы убедиться в правильности предварительной оценки симбиотических свойств штаммов в микроvegetационных опытах, симбиотические свойства 16 мутантов штамма СХМІ были изучены в вегетационных опытах. На основании результатов опытов были вычислены коэффициенты корреляции между показателями активности мутантов в микроvegetационных и вегетационном опытах. Полученные высокие значения коэффициентов корреляции (0,75-0,88) свидетельствуют о возможности использования микроvegetационных опытов для первичной массовой оценки симбиотических свойств мутантов.

Для того, чтобы оценить эффективность ступенчатого отбора при селекции клубеньковых бактерий, мы сравнили между собой результаты оценки симбиотических свойств мутантов первой ступени отбора, полученных у штамма СХМІ, и мутантов второй ступени отбора, полученных у штаммов СХМІ-70 и СХМІ-96 (табл.8).

В таблицу кроме высокоактивных мутантов, полученных при то-

Таблица 8

Изучение симбиотических свойств мутантов в вегетационных опытах

Мутант	Ступень отбора	Количество лет испытания	Средние отклонения от показателей штамма 425а, в %	
			по массе растений	по накоплению азота
425а	0	5	0	0
контроль б/и	-	5	-18,0	-15,8
R2MІ-12	I	3	6,1	14,0
СХМІ-71	I	3	9,6	6,4
СХМІ-97	I	3	9,9	7,8
СХМІ-96	I	3	10,7	15,6
СХМІ-49	I	3	11,2	13,5
СХМІ-44	I	3	9,0	16,0
СХМІ-105	2	4	9,3	17,3
СХМІ-110	2	4	9,8	17,4
СХМІ-147	2	3	12,7	25,7
СХМІ-148	2	3	13,7	23,5
СХМІ-215	2	2	11,9	20,6
СХМІ-214	2	2	12,2	27,4

тальном анализе клонов, вошли: морфологический мутант СХМІ-44, ревертаны ауксотрофного (R2MІ-12) и фагоустойчивых (СХМІ-214, СХМІ-215) мутантов, имеющие высокие показатели симбиотической активности. Можно видеть, что у мутантов второй ступени отбора эффективность выше, чем у мутантов первой ступени отбора. Наиболее сильно различие между этими группами мутантов выражается в накоплении азота, в меньшей степени - в прибавке массы растений.

Таким образом, ступенчатый отбор мутантов, индуцированных УФ-лучами, является эффективным способом получения штаммов с высокой симбиотической активностью.

#### 5. Изучение симбиотических свойств мутантов в полевых опытах

Для того, чтобы показать возможность использования полученных мутантов непосредственно в сельскохозяйственной практике, мы изучили симбиотическую активность некоторых из них в полевых опытах. Эффективность мутантов была изучена в деляночных опытах: СХМІ-71 - нами и научными учреждениями по программе Географической сети опытов с нитрагином в различных климатических зонах

страны, штаммов СХМ1-105 и СХМ1-214 - в Краснодарском НИИСХ им. Лукьяненко, а штамма СХМ1-105 - на Крымской областной сельскохозяйственной опытной станции "Элита" в полупроизводственных испытаниях на семенную продуктивность люцерны. Симбиотическая активность мутантов штамма СХМ1 была изучена нами в Крыму на базе Отдела почвенной микробиологии Южной зоны СССР при ВНИИСХМ.

Результаты испытания штаммов показали, что эффективность штамма СХМ1-71 в различных климатических зонах может сильно варьировать (табл. 9), однако в целом он обеспечил достоверное ( $F < 0,05$ ) увеличение урожая массы различных сортов люцерны на 5,5 % по сравнению с эталонным штаммом 425а. На сорте Зайкевича, на котором он был отобран, это увеличение было еще более существенным и составило 13,4 %.

Штамм СХМ1-105 превзошел эталонный штамм по урожаю сухой массы люцерны в среднем на 6,3 % (табл.10), а по сбору семян - на 22,9 % (табл.11).

При инокуляции штаммом СХМ1-214 прибавка урожая сухой массы была в среднем для пяти сортов люцерны на 9,2 % более высокой, чем при инокуляции штаммом 425а (табл.10).

В Крыму, кроме эффективности, у семи мутантов первой ступени отбора была изучена конкурентоспособность. Оказалось, что штаммы, имеющие приблизительно равную эффективность, могут существенно различаться по конкурентоспособности (от 18 до 62 %), причем наиболее конкурентоспособные штаммы обеспечивали максимальную прибавку массы растений (коэффициент корреляции между конкурентоспособностью штаммов и их эффективностью в полевом опыте оставался 0,79;  $P < 0,05$ ). Самой высокой конкурентоспособностью обладал штамм СХМ1-70.

Оценка конкурентоспособности мутантов второй ступени отбора СХМ1-105 и СХМ1-214, полученных у штамма СХМ1-70, показала, что признак высокой конкурентоспособности у них сохранился. Это свидетельствует о возможности селекции штаммов на повышенную эффективность при сохранении их высокой конкурентоспособности.

### ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция мутантов клубеньковых бактерий *R. meliloti*, включающая 56 ауксотрофных, 36 морфологических, 9 мутантов с измененной чувствительностью к бактериофагам и 44 мутанта с измененными симбиотическими свойствами (нецирулентные и не

Таблица 9  
Эффективность штамма СХМ1-71 в полевых испытаниях Географической сети опытов с нитрагином

Сорт люцерны	Место и год испытания	Урожай сухой зеленой массы (п/ге)		Прибавка урожая (%) относительно контроля шт. 425а	
		штамм 425а	штамм СХМ1-71	НСР <sub>0,05</sub>	контроля шт. 425а
Марушинская	Томский пед. ин-т, 1984	380,0	447,0	32,6	17,6
Марушинская	Томский пед. ин-т, 1985	320,0	377,0	25,0	17,8
Киевская пес-тро-гибридная	Львовский СХИ, 1982	252,0	320,0	13,5	27,0
" "	Львовский СХИ, 1986	166,5	190,3	23,4	14,6
" "	Львовский СХИ, 1985	245,8	258,0	39,5	13,5
Веселоподольская-2	Крым, ОПМ ЮЗ СССР, 1982-1984	521,1	620,4	100,7	22,4
Альфа-2	Кишиневский отдел микробиологии, 1985	356,7	425,7	42,0	19,6
Северная гибридная	Брянский СХИ, 1982-1983	482,3	585,5	14,9	21,4
" "	Вологодский молочный ин-т, 1983-1984	229,6	248,7	43,2	8,3
Белорусская	Брянский СХИ, 1982	108,3	138,8	12,9	28,2
Зайкевича	Львовский СХИ, 1982	260,0	340,0	40,4	40,0
" "	Цирковский НИИ Северо-Востока, 1982-1983	233,8	268,8	41,6	15,0
" "	Львовский СХИ, 1985	227,3	255,1	36,0	21,9
среднее по сортам	-	-	-	-	20,6
					5,5

Примечание. Подчеркнуты значения, достоверно превосходящие показатели контроля без инокуляции одной, контроля без инокуляции и штамма 425а - двумя линиями.

Таблица 10

Эффективность штаммов СХМ1-105 и СХМ1-214 в полевых условиях Краснодарского края (двух- и трехлетние опыты, снято по 7 и 10 уроков люцерны)

Сорт	Урожай сухой зеленой массы (ц/га)				Прибавка урожая (%) относительно	
	контроль 6/и	штамм 425а	испытуемый штамм	НСР <sub>0,05</sub>	контроля	шт. 425а
Славянская местная	956,1	930,5	963,7 <sup>ж</sup>	82,0	0,9	3,6
Краснодарская	907,7	931,2	935,4 <sup>жж</sup>	79,7	8,5	5,5
Терра	912,1	935,4	1025,7 <sup>жж</sup>	88,2	12,5	9,7
среднее по сортам	925,3	932,0	990,9	-	7,2	6,3
Кубанка	587,5	585,7	641,1 <sup>жж</sup>	53,6	9,1	9,5
Терра	575,0	605,4	635,7 <sup>жж</sup>	57,1	10,6	5,0
Спарта	612,5	619,6	707,1 <sup>жж</sup>	62,5	15,5	14,1
Маугли	532,1	605,4	653,6 <sup>жж</sup>	66,1	22,8	8,0
Славянская местная	539,3	608,9	667,9 <sup>жж</sup>	64,3	23,8	9,7
среднее по сортам	569,3	605,0	660,9	-	16,1	9,2

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 9. Отмечены значения, полученные при инокуляции штаммами: ж - СХМ1-105, жж - СХМ1-214.

Таблица 11

Эффективность штамма СХМ1-105 в полевых условиях Крыма (семенная продуктивность люцерны сорта Веселоподольная в год посева)

Опыт	Урожай семян (кг/га)				Прибавка урожая (%) относительно	
	контроль 6/и	штамм 425а	штамм СХМ1-105	НСР <sub>0,05</sub>	контроля	шт. 425а
1	34,75	41,00	48,25	6,18	38,9	17,7
2	44,67	55,67	71,33	9,22	59,7	28,1
среднее по опытам	-	-	-	-	49,3	22,9

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 9.

фиксирующие азот, с пониженной и повышенной азотфиксирующей активностью и эффективностью).

2. Выявлена зависимость частоты возникновения мутантов разных типов от дозы УФ-лучей: максимальная частота индукции ауксотрофных мутантов наблюдается при дозе 60 Дж/м<sup>2</sup>, а морфологических -

при 180-240 Дж/м<sup>2</sup>. Оптимальной для получения мутантов с количественно измененной симбиотической активностью является доза 60 Дж/м<sup>2</sup>, тогда как для индукции мутантов, утративших симбиотическую активность (нефиксирующих и невирулентных), - 240 Дж/м<sup>2</sup>.

3. Установлено, что для мутантов, утративших симбиотическую активность, имеется связь между изменениями их симбиотических и культуральных свойств. Так, у морфологических и фитоустойчивых мутантов утрата способности образовывать клубеньки или фиксировать азот сопровождается отсутствием или увеличением экскреции полисахаридов с одновременной утратой стрептомициноустойчивости.

4. Показано, что реверсия к родительскому типу у ауксотрофных и морфологических мутантов может сопровождаться изменением их симбиотических свойств. Некоторые мутанты обладают способностью выщеплять ревертантов с широким диапазоном изменчивости по азотфиксирующей активности и эффективности (от значений, превосходящих показатели прародительских штаммов, до полного отсутствия способности фиксировать азот).

5. Показано, что ступенчатый отбор мутантов, индуцированных УФ-лучами, является эффективным способом получения высокоактивных штаммов клубеньковых бактерий.

6. Выявлено 3 мутанта, превосходящих эталонный штамм 425а по увеличению урожая сухой массы люцерны в полевых опытах до 18% (в зависимости от сорта), а по сбору семян - на 18-28%.

7. Показано, что величина прироста урожая люцерны, инокулированной мутантами, коррелирует с их конкурентоспособностью в условиях полевого опыта.

#### Работы, опубликованные по материалам диссертации:

1. Федоров С.Н. Симбиотические свойства морфологических мутантов *Rhizobium meliloti*. - Тр. ВНИИСХМ, 1979, т.48, с.158-163.

2. Федоров С.Н., Бутвина О.Ю., Симаров Б.В. Изучение симбиотических свойств ауксотрофных и морфологических мутантов *Rhizobium meliloti*, полученных под действием УФ-света. - IV Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов». Тезисы докладов. М., 1979, с.136.

3. Алисова С.М., Афанасьева Л.М., Васильева Н.Д., Васильев Л.Ф., Доросинский Л.М., Загорье И.В., Зарецкая А.Н., Лаптев Г.Ю., Новикова А.Т., Федоров С.Н., Симаров Б.В. Методические рекоменда-

ции по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. Л., 1979, 33 с.

4. Симаров Б.В., Федоров С.Н. Методы изучения генетически маркированных мутантных штаммов клубеньковых бактерий. — Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии «Методы исследований клубеньковых бактерий». Л., 1981, с.19-26.

5. Федоров С.Н., Бутвина О.Ю., Симаров Б.В. Мутагенное действие УФ-излучения на клубеньковые бактерии люцерны и изучение симбиотических свойств полученных аукоотрофных мутантов. — Генетика, 1983, т.19, с.427-436.

6. Федоров С.Н. Зависимость азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий люцерны от типа возникших мутаций. — Бюлл. ВНИИСКХМ, 1983, № 37, с.6-11.

7. Кучко В.В., Федоров С.Н., Фокина И.Г., Баженова О.В., Ароштан А.А., Симаров Б.В. Роль плазмид в детерминации симбиотических свойств клубеньковых бактерий. «Молекулярные механизмы генетических процессов». У Всесоюзный симпозиум. Тезисы докладов М., 1983, с.106-107.

8. Ароштан А.А., Баженова О.В., Зарецкая А.Н., Кучко В.В., Новикова Н.И., Проворов Н.А., Федоров С.Н., Фокина И.Г., Чернова Т.А., Симаров Б.В. Генетические методы селекции клубеньковых бактерий (методические рекомендации). Л., 1984, 37 с.

9. Проворов Н.А., Симаров Б.В., Федоров С.Н. Влияние мутаций аукоотрофности и устойчивости к антибиотикам на симбиотические свойства клубеньковых бактерий. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1984, № 3, с.337-352.

10. Проворов Н.А., Симаров Б.В., Федоров С.Н. Симбиотические свойства разных типов мутантов клубеньковых бактерий. — Изв. АН СССР, сер. биол., 1985, № 6, с.870-884.

11. Федоров С.Н., Симаров Б.В. Симбиотические свойства аукоотрофных мутантов клубеньковых бактерий люцерны *Rhizobium meliloti*. — С/х биология, 1985, № 8, с.20-26.

12. Федоров С.Н., Фокина И.Г., Симаров Б.В. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) в лабораторных условиях. — С/х биология, 1986, № 1, с.112-118.

13. Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов клубеньковых бактерий *Rhizobium meliloti* измененными симбиотическими свойствами под действием УФ-излучения. — С/х биология, 1987, № 9, с.44-49.

Ртп. Тип. Вир. Зак. 1394. Тип. 100. М-26299. 23.10.87.