

Jolanta MAKUCH, Aleksandra MELKE

### Właściwości symbiotyczne mutantów auktrotroficznych *Rhizobium*

Симбиотические свойства ауксотрофных мутантов *Rhizobium*

Symbiotic Properties of Auxotrophic *Rhizobium* Mutants

Szeroki zakres mutacji prowadzących do auktrotrofizmu, oporności na antybiotyki i na różne antymetabolity modyfikuje symbiotyczną aktywność szczepów *Rhizobium*. Schwinghamer (7) stosując NTG uzyskał szczep *R. leguminosarum*, wymagający adeniny i tiaminy, który utracił efektywność po mutacji do auktrotrofizmu. Scherrer i Dénarié (6) wykazali związek między wymaganiami odżywczymi a efektywnością wiązania azotu u *R. meliloti*. Puryno- i pirymidynozależne mutanty były nieefektywne, podczas gdy cysteino- i metioninozależne mutanty wykazywały taką samą efektywność jak szczep dziki. Mutanty wymagające glicyny były bardziej efektywne niż szczep wyjściowy. Wszystkie prototroficzne rewertanty nieefektywnych auktrotroficznych szczepów stały się ponownie efektywne.

W przeciwieństwie do tych danych w naszych poprzednich badaniach wszystkie testowane streptomycynooporne i auktrotroficzne mutanty, izolowane z infekcyjnych i efektywnych szczepów *Rhizobium* były defektywne w efektywności lub infekcyjności (3, 4, 8).

W celu określenia wpływu mutacji auktrotroficznych, warunkujących zanik syntezy pewnych aminokwasów i zasad na proces wiązania azotu, aktywność wiązania azotu mierzono aktywnością nitrogenazy. Stwierdzono (1), że nitrogenaza katalizuje nie tylko redukcję azotu, ale także redukcję acetyleny oraz innych związków spokrewnionych chemicznie z cząsteczką azotu. Acetylen i powstający pod wpływem redukcji nitrogenazy etylen są mierzone przy pomocy chromatografii gazowej. Metoda ta jest bardzo czuła.

## MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne: *R. trifolii* T37 i *R. meliloti* L5-30.

Podłoże: *R. trifolii* T37 namnażano w podłożu Thorntona (Th). Do izolacji mutantów auktotroficznych *R. trifolii* T37 używano podłoże minimalne 3 (MM<sub>3</sub>), zawierające (g/l H<sub>2</sub>O dest.): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 3,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,4; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,05; NaCl — 0,5; cytrynian żelazowo-amonowy — 0,005; KNO<sub>3</sub> — 0,6; mannitol — 10,0; pH=7,4. *R. meliloti* L5-30 hodowano w podłożu „5”+0,1% hydrolizatu kazeiny o następującym składzie: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,2 g; NaCl — 0,2 g; CaCO<sub>3</sub> — 0,5 g; wyciąg drożdżowy — 200 ml; H<sub>2</sub>O — 800 ml, pH=7,2. Hodowlę *R. meliloti* L5-30 wysiewano na stałe podłoże „79”+0,1% CA o składzie podobnym do podłoża „5”, jedynie uzupełnionego mannitolem — 10 g/l. Mutanty auktotroficzne *R. meliloti* izolowano na podłożu minimalnym 5 (MM<sub>5</sub>) o składzie podobnym do MM<sub>3</sub>. TM — bufor składał się z Tris (2-amino-2(hydroxymethyl)propane-1,3-diol) w końcowym stężeniu 0,05 M i kwas maleinowy — 0,05 M; pH doprowadzone do 6,0. Podłoże dla roślin: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,5 g; MgSO<sub>4</sub> — 0,2 g; NaCl — 0,1 g; Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> — 2 g; FeSO<sub>4</sub> — 0,01 g; H<sub>2</sub>O — 1000 ml; pH=7,0.

Izolacja mutantów auktotroficznych: 18-godzinną hodowlę *Rhizobium* w pełnym podłożu rozcieńczano 5-krotnie świeżym podłożem i inkubowano — wytrząsając w 28° do optycznej gęstości 0,2. Następnie hodowlę ochładzano, wirovano i przemywano 10 ml zimnego TM buforu. Po odwirowaniu i ponownym zawieszeniu osadu bakteryjnego w 10 ml TM buforu dodawano 2 mg N-methyl-N'-nitrozoguanidyny (NTG). Potem hodowlę inkubowano przez 60 min. w 37°. Zwykle 50% bakterii przeżywało traktowanie NTG. Po mutagenizacji bakterie odwirowywano, przemywano zimnym podłożem minimalnym i zawieszano w 10 ml podłoża pełnego. Zawiesinę inkubowano — wytrząsając w 28° przez 18 godz. Po inkubacji hodowlę odwirowywano i ponownie zawieszano w podłożu minimalnym do końcowej gęstości 10<sup>6</sup> kom./ml. Po 6 godz. inkubacji z wytrząsaniem dodawano 1500 jedn./ml penicyliny. Inkubację z antybiotykiem kontynuowano przez 6 godz. bez wytrząsania. Następnie hodowlę odwirowywano, osad przemywano podłożem minimalnym i zawieszano w podłożu pełnym do 12-godz. inkubacji. Po tym czasie hodowlę wysiewano na pełne podłoże stałe. Pojedyncze kolonie bakterii z podłoża pełnego przenoszono na podłoże minimalne i pełne. Wymagania odżywcze mutantów auktotroficznych określano metodą Lederberga (2).

Aktywność symbiotyczna *Rhizobium*. W celu określenia właściwości symbiotycznych badanych szczepów zakażano nimi rośliny koniczyny czerwonej i lucerny w testach próbowkowych. Wyjałowione (0,1% HgCl<sub>2</sub> i 75% alkoholem etylowym) i podkiełkowane nasiona koniczyny i lucerny nanoszono po jednym do próbek, zawierających podłoże dla roślin bez azotu mineralnego oraz podłoże wzbogacone KNO<sub>3</sub> w ilościach 0,01—0,05%. Po dwóch dniach rośliny zakażano 18 godz. hodowlą badanych szczepów o gęstości 10<sup>8</sup> kom./ml. Rośliny inkubowano w pomieszczeniu vegetacyjnym w temp. 23°. Stopień aktywności badanych szczepów określano po 4 i 5 tygodniach vegetacji roślin. Do roślin w szczelnie zamkniętych próbkach wstrzykiwano acetylen do końcowego stężenia 10% v/v. Rośliny trzymano w oświetlonym pomieszczeniu. Co 2 godz. pobierano próbkę gazu i wykonywano pomiar na chromatografie. Badania wykonywano na chromatografie Chromatoprep typ N-502 na szklanej kolumnie oraz na Gas-Chromatograph GCHF 18.3 na metalowej kolumnie. W obu przypadkach kolumny były wypełnione Porapakiem T. Gazem nośnym był azot. Po skończeniu pomiarów chromatograficznych wykonywano pomiary wysokości części zielonej roślin, masy części nadziemnej i brodawek. Następnie w brodawkach oznaczano ilość białka metodą Lowry (5).



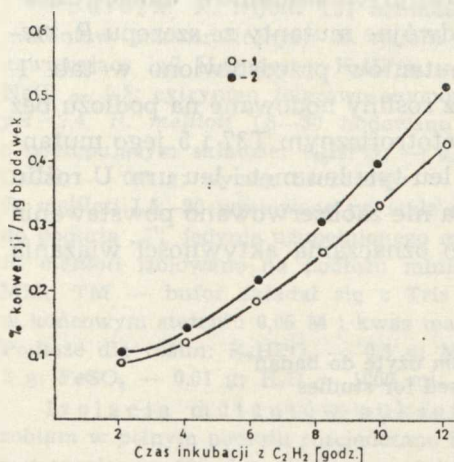
## WYNIKI

Używając NTG wyizolowano 5 podwójnych mutantów auksotroficznych ze szczepu *R. trifolii* T37 oraz 4 podwójne mutanty ze szczepu *R. meliloti* L5-30. Genotypy otrzymanych mutantów przedstawiono w tab. 1. Początkowo badano wiązanie azotu przez rośliny hodowane na podłożu bez dodatku  $KNO_3$ , a zakażone szczepem prototroficznym T37 i 5 jego mutantami auksotroficznymi; leu his; leu orn; leu tyr; leu met i leu ura. U roślin zakażonych mutantami: leu met i leu ura nie zaobserwowano powstawania brodawek, dlatego też nie użyto ich do oznaczania aktywności wiązania azotu.

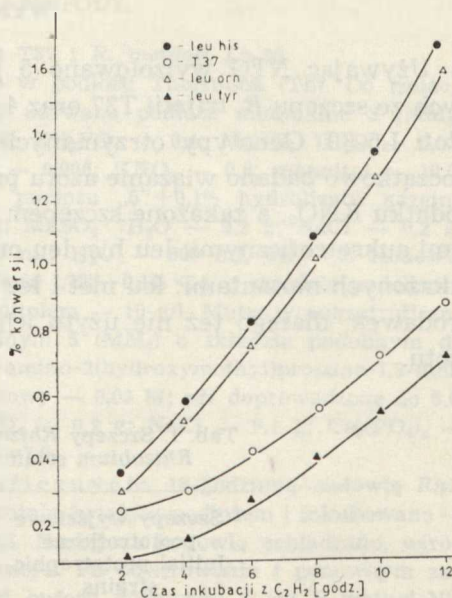
Tab. 1. Szczepy *Rhizobium* użyte do badań  
*Rhizobium* strains used for studies

Szczepy wyjściowe prototroficzne Initial prototrophic strains	Genotypy mutantów Mutants genotypes
<i>Rhizobium trifolii</i> T37	1) leu his 2) leu orn 3) leu tyr 4) leu met 5) leu ura
<i>Rhizobium meliloti</i> L5-30	1) leu his 2) leu met 3) leu trp 4) leu cys

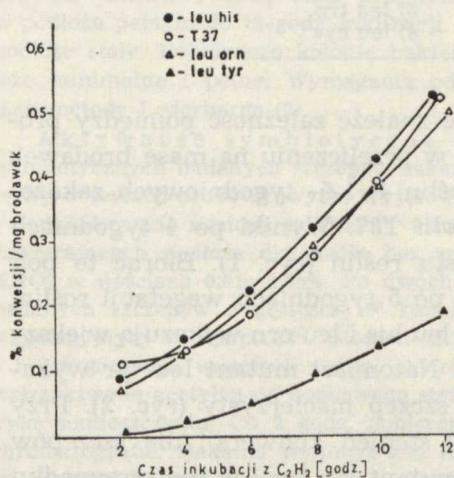
We wstępnych badaniach starano się znaleźć zależność pomiędzy procentem konwersji acetylenu do etylenu w przeliczeniu na masę brodawek a czasem inkubacji z acetylenem dla roślin 4- i 5- tygodniowych zakażonych szczepem prototroficznym *R. trifolii* T37. Wyniki po 4 tygodniach były niższe niż po 5 tygodniach wzrostu roślin (ryc. 1). Biorąc to pod uwagę, następne pomiary wykonywano po 5 tygodniach wegetacji roślin. Stwierdzono, że mutanty *R. trifolii* T37: leu his i leu orn wykazują większy procent konwersji niż dziki szczep T37. Natomiast mutant leu tyr wykazywał niższy procent konwersji niż szczep macierzysty (ryc. 2). Przy uwzględnieniu masy brodawek (ryc. 3) stopień konwersji dla szczepów T37: leu his i leu orn był podobny, zaś mutant leu tyr i w tym przypadku wykazywał najniższy procent konwersji. Przeprowadzone doświadczenia wykazały brak brodawek u wszystkich roślin lucerny zakażonych czterema podwójnymi mutantami auksotroficznymi, otrzymanymi ze szczepu



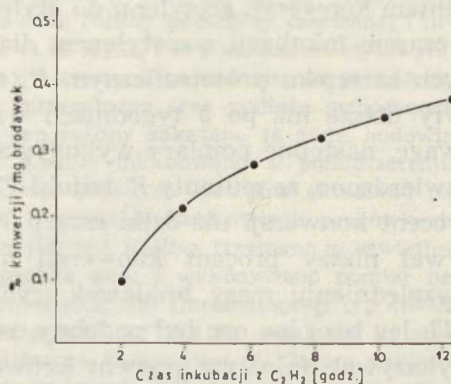
Ryc. 1. Aktywność nitrogenazy roślin cztero- i pięcioletnich zakażonych szczepem prototroficznym *R. trifolii* T37; 1 — po 4 tygodniach, 2 — po 5 tygodniach  
Nitrogenase activity of four- and five-week old plants infected with prototrophic *R. trifolii* T37 strain; 1 — after 4 weeks, 2 — after 5 weeks



Ryc. 2. Konwersja acetyleny do etylenu przez rośliny zakażone mutantami aukso-troficznymi *R. trifolii* T37  
Conversion of acetylene into ethylene by plants infected with auxotrophic *R. trifolii* T37 mutants



Ryc. 3. Aktywność nitrogenazy mutantów aukso-troficznych w stosunku do masy brodawek  
Nitrogenase activity of auxotrophic mutants in relation to mass of nodule bacteria



Ryc. 4. Aktywność nitrogenazy *R. meliloti* L5-30 w stosunku do masy brodawek  
Nitrogenase activity of *R. meliloti* L5-30 in relation to mass of nodule bacteria

Tab. 2. Korelacja między wysokością rośliny, masą części zielonej, zawartością białka i masą brodawek  
Correlation between the height of plant, mass of green part, content of protein and mass of nodule bacteria

Rośliny zakażone szczepem Plants infected with strain	Wysokość części zielonej Height of green part (mm)	Masa części zielonej Mass of green part (mg)	Ilość białka w brodawkach Quantity of protein in nodule bacteria (γ)	Masa brodawek Mass of nodule bacteria (mg)
T37	77	77	204	1,6
leu his	126	104	222	3,2
leu orn	107	72	220	2,5
leu tyr	108	74	214	3,2
L5-30	73	62	209	1,1
Rośliny kontrolne Control plants	62	36	—	—

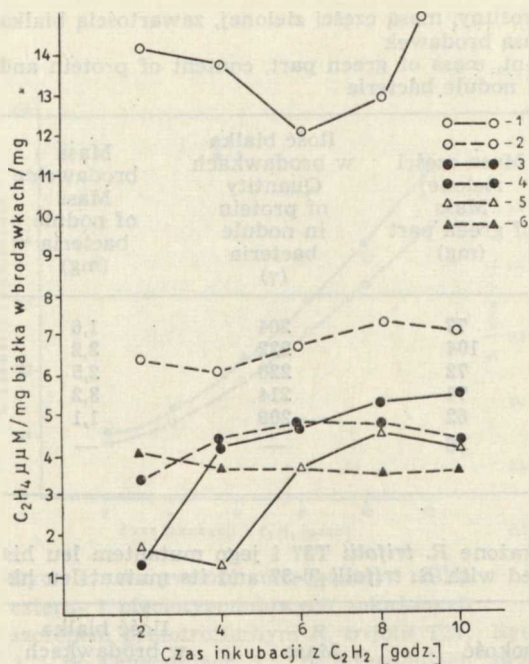
Tab. 3. Wpływ podłoża na rośliny zakażone *R. trifolii* T37 i jego mutantem leu his  
Influence of medium on plants infected with *R. trifolii* T-37 and its mutant leu his

Szczepy Strains	Podłoża Breeding- grounds	Wysokość części zielonej Height of green part (mm)	Masa części zielonej Mass of green part (mg)	Ilość białka w brodawkach Amount of protein in nodule bacteria (γ)
T37	bez KNO <sub>3</sub> without KNO <sub>3</sub>	84	72	205
	+0,01% KNO <sub>3</sub>	71	50	134
	+0,02% KNO <sub>3</sub>	61	49	100
leu his	bez KNO <sub>3</sub> without KNO <sub>3</sub>	118	99	210
	+0,01% KNO <sub>3</sub>	86	56	144
	+0,02% KNO <sub>3</sub>	70	46	112

*R. meliloti* L5-30: leu his; leu met; leu trp i leu cys. Ponieważ na korzeniach niektórych roślin były zgrubienia — sprawdzono aktywność symbiotyczną tych roślin metodą redukcji acetylenu. Nie stwierdzono jednak wykrywalnych ilości etylenu. Aktywność symbiotyczną prototroficznego szczepu *R. meliloti* L5-30 przedstawiono na ryc. 4.

Badając korelację między wysokością rośliny, masą części zielonej, zawartością białka i masą brodawek wykazano, że rośliny zakażone szczepami auksotroficznymi: leu his, leu orn i leu tyr były znacznie wyższe niż rośliny zakażone szczepem T37. Masa brodawek i ilość białka u roślin zakażonych tymi podwójnymi mutantami była także wyższa niż u roślin zakażonych niezmutowanym szczepem T37 (tab. 2).





Ryc. 5. Wpływ  $KNO_3$  na aktywność nitrogenazy szczepu *R. trifolii* T37 i jego mutanta; 1, 3, 5 — leu his, 2, 4, 6 — T37; 1, 2 — podłoże bez  $KNO_3$ , 3, 4 — podłoże +0,01%  $KNO_3$ , 5, 6 — podłoże +0,02%  $KNO_3$ .  
Effect of  $KNO_3$  on nitrogenase activity of *R. trifolii* T37 strain and of its mutant; 1, 3, 5 — leu his, 2, 4, 6 — T37; 1, 2 — medium without  $KNO_3$ , 3, 4 — medium +0.01%  $KNO_3$ , 5, 6, medium +0.02%  $KNO_3$ .

Badano również redukcję acetyleny przez rośliny hodowane na podłożu z dodatkiem  $KNO_3$ , a zakażone szczepem *R. trifolii* T37 i jego mutantem auksotroficznym leu his. Przeprowadzono doświadczenia z dodatkiem różnych ilości — od 0,01% do 0,05%  $KNO_3$  w podłożu. Okazało się, że dodatek większej ilości niż 0,02%  $KNO_3$  do podłoża hamuje całkowicie proces brodawkowania. Przy dodatku 0,01%  $KNO_3$  ilość brodawek była mniejsza niż u roślin hodowanych na podłożu bez  $KNO_3$ , zaś przy dodatku 0,02%  $KNO_3$  do podłoża obserwowano tylko pojedyncze brodawki. Dodatek 0,01%  $KNO_3$  do podłoża (tab. 3) powodował, że rośliny zakażone zarówno szczepem T37, jak i jego mutantem leu his były nieco niższe od roślin hodowanych na podłożu bez  $KNO_3$ , a ilość białka zawartego w brodawkach zmniejszyła się o 1/3 w porównaniu z ilością białka w roślinach hodowanych bez dodatku  $KNO_3$ . Natomiast dodatek 0,02%  $KNO_3$  powodował zmniejszenie ilości białka o 1/2 w stosunku do roślin hodowanych na podłożu bez dodatku  $KNO_3$ .

Produkcja etylenu w przypadku mutanta leu his była prawie 3-krotnie wyższa na podłożu bez  $KNO_3$  niż na podłożu z dodatkiem 0,01% i 0,02%  $KNO_3$  (ryc. 5). U roślin zaś zakażonych szczepem T37 i hodowanych na podłożu bez  $KNO_3$  ilość wytwarzanego etylenu była 2-krotnie niższa w porównaniu ze szczepem leu his.  $KNO_3$  hamował częściowo aktywność nitrogenazy szczepu T37.

## PIŚMIENNICTWO

1. Dilworth M. J.: Acetylene Reduction by Nitrogen-Fixing Preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 285—294 (1966).
2. Lederberg J.: Isolation and Characterization of Biochemical Mutants of Bacteria. *Meth. med. Res.* **3**, 5—22 (1950).
3. Lorkiewicz Z., Melke A.: Infectiveness of the Histidine Dependent Mutant of *Rhizobium trifolii*. *Acta Microbiol. Polon.*, *Seria A* **2**, (19), 75—77 (1970).
4. Lorkiewicz Z., Żurkowski W., Kowalczyk E., Górska - Melke A.: Mutagenesis and Conjugation in *Rhizobium trifolii*. *Acta Microbiol. Polon.* **3**, (30), 101—107 (1971).
5. Lowry O. H., Rosebrough W. J., Forr A. L., Randall R. J.: Protein Measurement with the Folin Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1961).
6. Scherrer A., Dénarié J.: Symbiotic Properties of some Auxotrophic Mutants of *Rhizobium meliloti* and their Prototrophic Revertants. *Plant and Soil*, Special Volume, 39—45 (1971).
7. Schwinghamer E. A.: Mutation to Auxotrophy and Prototrophy as Related to Symbiotic Effectiveness in *R. leguminosarum* and *R. trifolii*. *Can. J. Microb.* **15**, 611—622 (1969).
8. Żelazna - Kowalska I., Lorkiewicz Z.: Transformation in *Rhizobium trifolii*. IV. Correlation between Streptomycin Resistance and Infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Acta Microbiol. Polon.* **3** (20), 11—20 (1971).

## РЕЗЮМЕ

Применяя N-метил-N'-нитрозогуандин. (N-methyl-N-nitrosoquanidine) из штамма *R. trifolii* T37 были выделены 5 двойных ауксотрофных мутантов: leu his, leu orn, leu tyr, leu met, leu ura и 4 двойных ауксотрофных мутанта из штамма *R. meliloti* L5-30: leu his, leu met, leu trp, leucys. Установлено, что мутанты *R. trifolii* T37: leu his, leu orn проявляют активность нитрогеназы, похожую на исходный штамм. Зато мутант T-37 leu tyr вызывал редуцирование ацетилена в этилен в низшей степени. Оказались неэффективными два ауксотрофных мутанта штамма *R. trifolii* T37: leu met, leu ura и все мутанты штамма *R. meliloti* L5-30. Было замечено, что добавление к питательной среде  $KNO_3$  (свыше 0,02%) полностью задерживает процесс образования клубеньков.

## SUMMARY

N-methyl-N-nitrosoquanidine was used for isolation of five double auxotrophic mutants from *R. trifolii* T37 (leu his, leu orn, leu tyr, leu met and leu ura) and four double auxotrophic mutants of *R. meliloti* L5-30 (leu his, leu met, leu trp and leu cys). It was found that two *R. trifolii* T37 mutants — leu his and leu orn — show nitrogenase activity similar to that of the original strain, whereas the mutant T37 — leu tyr performed the conversion of acetylene into ethylene in a lower degree. Two auxotrophic mutants of *R. trifolii* T37 — leu met and leu ura — as well as mutants *R. meliloti* L5-30 proved to be ineffective. It has been observed that the addition of over 0.02%  $KNO_3$  to the medium completely stops the process of nodulation.

MEMORANDUM

1. Dr. phil. M. J. A. ...  
 2. Dr. phil. M. J. A. ...  
 3. Dr. phil. M. J. A. ...  
 4. Dr. phil. M. J. A. ...  
 5. Dr. phil. M. J. A. ...  
 6. Dr. phil. M. J. A. ...  
 7. Dr. phil. M. J. A. ...  
 8. Dr. phil. M. J. A. ...  
 9. Dr. phil. M. J. A. ...  
 10. Dr. phil. M. J. A. ...

11. Dr. phil. M. J. A. ...  
 12. Dr. phil. M. J. A. ...  
 13. Dr. phil. M. J. A. ...  
 14. Dr. phil. M. J. A. ...  
 15. Dr. phil. M. J. A. ...  
 16. Dr. phil. M. J. A. ...  
 17. Dr. phil. M. J. A. ...  
 18. Dr. phil. M. J. A. ...  
 19. Dr. phil. M. J. A. ...  
 20. Dr. phil. M. J. A. ...