

УДК 576.871.155. 557

БІОТЕХНОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ ЕФЕКТИВНИХ Тn5-МУТАНТІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ КОНЮШИНИ *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Н. А. Воробей¹
В. М. Заєць²
С. Я. Коць¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: n-vorobey@ukr.net

Отримано 03.10.2011

За допомогою плазмідного вектора pSUP2021::Tn5 було проведено мутагенез штаму 348a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Частота виникнення Km^R-мутантів за перенесення цього вектора з *Escherichia coli* в *Rhizobium* становила $1,9 \cdot 10^{-7}$. Інсерційну природу отриманих мутантів доведено з використанням полімеразної ланцюгової реакції. За симбіотичними показниками та Eff⁺-фенотипом рослин конюшини в умовах мікровеgetаційного та вегетаційного дослідів здійснено скринінг Tn5-мутантів та відібрано ризобії з підвищеним синтезом нітрогенази і господарсько-цінними властивостями. Tn5-мутанти T2к, T28к, T72к суттєво перевершували інші ризобії за нодуляційною активністю. Під час фази цвітіння конюшини на коренях рослин за їх участю утворилося в 1,4–1,7 раз більше бульбочок, які домінували за масою. З посиленням ризогенезу надземна маса рослин збільшилась на 29,6–41,8%. Інтенсифікація фізіологічних процесів у конюшини забезпечувалася збільшенням нітрогеназної активності симбіотичного апарату, яка у фазі початку цвітіння перевищувала в середньому в 2,5 раз показники рослин, інокульованих вихідним (батьківським) штамом 348a. Отримані дані свідчать про можливість створення високоефективних симбіотичних систем конюшина — Tn5-мутанти *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Ключові слова: транспозоновий мутагенез, Tn5-мутанти, полімеразна ланцюгова реакція, конюшина, симбіоз, азотфіксувальна активність, ефективність.

Багаторічні бобові трави є важливими кормовими культурами, які в симбіозі з бульбочковими бактеріями здатні забезпечити свої потреби в азоті за рахунок біологічної азотфіксації [1–3]. Вони відіграють вирішальну роль у скороченні дефіциту рослинного протеїну, а також виконують основну функцію в біологізації землеробства, справляючи вплив на родючість ґрунту і стан довкілля [4].

Конюшина — культура з високим симбіотичним потенціалом [5, 6]. Оскільки в Україні вона вирощується досить давно, у ґрунтах присутні дикі «агресивні» популяції бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, які зазвичай мають низький рівень азотфіксувальної активності [7]. Оптимізувати азотне живлення конюшини можна бактеризацією її насіння високоактивними штамми бульбочкових бактерій.

Тривалий час генетичною базою для селекції активних штамів слугували бактерії, виділені з природних біоценозів [8–10] або одержані за дії фізичних і хімічних мутагенів [11, 12]. Використання методів молекулярної генетики та генної інженерії, зок-

рема гібридизації й транспозонового мутагенезу, дало змогу значно розширити спектр спадкової мінливості ризобій [13, 14]. Згідно з даними літератури застосування транспозонового мутагенезу до бульбочкових бактерій спричинює появу широкого спектра клітин із поодинокими мутаціями [15–21]. Зміни, що відбуваються у геномі мікросимбіонта, призводять як до редукції симбіотичного потенціалу, так і до поліпшення господарсько-цінних властивостей бульбочкових бактерій.

Метою роботи було отримати транспозонові мутанти бульбочкових бактерій конюшини з підвищеною вірулентністю, азотфіксувальною активністю і створити на їх основі високоефективні симбіотичні системи конюшина — *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Матеріали і методи

В експериментах використано штамми бульбочкових бактерій конюшини *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* B₁(1000)NN,

B₁(100)E, B₁(-10)E, C10, 8St, 500, 348a, 346 та штамп S17-1(pSUP2021::Tn5) *Escherichia coli* з колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Плазмідний вектор pSUP2021 створено на основі мультикопійної немобілізувальної плазмиди pBR325 *E. coli* з обмеженим спектром хазяїв, не здатної до реплікації у клітинах бульбочкових бактерій [22]. Плазміда має фактори стійкості до антибіотиків, у тому числі й до канаміцину (Km) у концентрації 200 мкг/мл, цю стійкість кодує транспозон Tn5. Характеристики штаму наведено в табл. 1. Антибіотики стрептоміцин (Str), канаміцин (Km) належать до класу аміноглікозидів, добре розчинні у воді й погано — у ліпідах [23].

Таблиця 1. Характеристика *Escherichia coli* S17-1

Штам, плазміда	Характеристика
<i>E. coli</i> S17-1	Мобілізувальний штам, донор SUP-векторів
Плазміда pSUP2021	(pBR325-MobRP4)::Tn5, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R

Бульбочкові бактерії вирощували на агаризованому середовищі 79 (г/л дист. води): K₂HPO₄ · H₂O — 0,5; MgSO₄ · 7H₂O — 0,2; NaCl — 0,1; CaCO₃ — сліди; дріжджовий екстракт — 2; казамінові кислоти або лактальбумін — 0,5; маніт — 10; pH середовища — 7,2–7,4, стерилізація за 0,8 — 1 атм протягом 30 хв, три доби за 28 °С, *E. coli* S17-1 — на середовищі LB [24] за 37 °С одну добу.

Транспозоновий мутагенез. Спектр штампів-реципієнтів обмежений особливостями векторної плазмиди pSUP2021::Tn5, яка входить до складу геному *E. coli* S17-1. Компетентні штами-реципієнти мають бути чутливі до 25–50 мкг/мл Km у середовищі вирощування і резистентні до 800–1000 мкг/мл Str. Уведення транспозона Tn5 до клітин ризобій здійснено з використанням *E. coli* S17-1 за методикою, описаною в літературі [19, 24, 25] у нашій модифікації. Бактеріальні культури донора та реципієнта змішували у співвідношенні 1 : 5 в 0,5 мл стерильної води. Суміш клітин переносили на агаризоване середовище TY [24] в чашки Петрі та інкубували при +28 °С протягом 6 год (зважаючи на те, що подвоєння клітин швидко рослих ризобій відбувається за 4–6 год). Після цього бактерії змивали з поверхні середовища стерильною водою (5 мл) і суспендували. Готували послідовні 10-, 100-кратні і т. д. розведення кон'югаційної суміші клітин та висівали на селективні середови-

ща по 0,2 мл. Для відбору Tn5-мутантів селективним середовищем слугувало TY + 200 Km + 500 Str (мкг/мл). Контрелекцію клітин (елекцію проти штаму-донора *E. coli*) проводили на середовищі TY + 800 мкг/мл Str.

Частоту транспозиції (V) обчислювали за співвідношенням:

$$V = \frac{\text{Кількість клітин в 0-розведенні, вирощених на TY + Km + Str}}{\text{Кількість клітин в x-розведенні, вирощених на TY + Str.}}$$

Виділення геномної ДНК. У роботі використано реактиви та ензими: трис (Tris [hydromethyl] — aminomethane), агарозу фірм Sigma та Serva, етилендіамінотетраоцтову кислоту (ЕДТА) та цетилтриетиламонійбромід (ЦТАБ), протеїназу К та рибонуклеазу А фірми Sigma, додецилсульфат натрію (ДДС) фірми BDH, бромистий етидій фірми Calbiochem, солі NaCl, MgCl₂, оцтовий Na та борну кислоту — вітчизняного виробництва марок хч та осч, Taq-полімераза та реактиви для ПЛР — фірми Fermentas.

Клітини бульбочкових бактерій відмивали від полісахаридів і двічі промивали буфером TE (10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1mM EDTA за допомогою центрифугування на мікроцентрифугу Ерпендорф при 6 000 об/хв). Відмитий осад культури суспендували для лізису клітин в 0,547 мл буфера TE, додавали 30–50 мкл 10% додецилсульфату Na (ДДС) та протеїназу К до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Лізис проводили за температури 37 °С упродовж 60 хв. Для додаткового лізису та подальшого очищення нуклеїнових кислот до лізату додавали 100 мкл 5M NaCl і 80 мкл 10% ЦТАБ в 0,7 M NaCl та інкубували його 15–20 хв при 60 °С. Нуклеїнові кислоти депротейнізували рівним об'ємом суміші хлороформ–ізоаміловий спирт у співвідношенні 24 : 1, центрифугували при 12 000 об/хв протягом 10 хв для осадження денатурованих протеїнів та полісахаридів. Водну фазу з нуклеїновими кислотами відбирали і повторно депротейнізували таким самим розчином хлороформ–ізоаміловий спирт, як і раніше. У водний розчин нуклеїнових кислот додавали РНК-азу для гідролізу РНК до концентрації 50 мкг/мл й інкубували за кімнатної температури 20–30 хв. ДНК із водної фази осаджували рівним об'ємом 100%-го ізопропанолу або 2,5 об'ємами 96%-го етанолу за 12 000 об/хв впродовж 10 хв, потім відмивали 70%-м етанолом і розчиняли в 50 мкл буфера TE. Для

Таг-полімеразної реакції використовували 1 мкл розчину ДНК.

ПЛР-ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Proteus (Великобританія) в об'ємі 30 мкл у ПЛР-буфері фірми Fermentas, що містив 2 mM $MgCl_2$ і 0,2 mM кожного dNTP. Умови проведення реакції: початкова денатурація 2–3 хв за 95 °С, наступні 25 циклів денатурації, гібридизації та синтезу виконували відповідно за 95 °С — 30 с, за 58 °С — 30 с та 72 °С — 45 с. Останній синтез проводили за 72 °С 5 хв. На один зразок використовували 50 нг ДНК, 0,25 мкмоль/л кожного праймера та 1U Таг-полімерази.

Праймери для ПЛР сконструювали за допомогою програми Primer-3 на структурну послідовність гена неоміцинофотрансферази Tn5 завдовжки 517 нуклеотидних пар:

5' – CTGAATGAACCTGCAGGACGAG – 3' прямий праймер

5' – CAATATCACGGGTAGCCCAACG – 3' зворотний праймер.

Продукти ПЛР-реакції аналізували за допомогою електрофорезу в 0,7%-му агарозному гелі [26, 27] з бромистим етидієм.

Первинний скринінг Tn5-мутантів *R. leguminosarum* bv. *trifolii* за симбіотичними властивостями і Eff⁺-фенотипом рослин здійснювали в умовах стерильного мікроегетатційного дослідження [28] при 20–25 °С, 16-годинному фотоперіоді й додатковому освітленні 40 000 лк (рис. 1, А, 1, Б).

Експерименти проведено з рослинами конюшини червоної *Trifolium pratense* L. (сорт Дарунок селекції Інституту землеробства НААН України). В умовах вегетатійного дослідження рослини вирощували у 10-кілограмових посудинах Вагнера, простерилізованих 20%-м розчином H_2O_2 . Як субстрат використовували промитий річковий пісок, збагачений мінеральною сумішшю Гельріге-ля [29] з 0,25 н азоту (1 норма відповідає 708 мг $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ на 1 кг піску). Перед посівом насіння конюшини стерилізували 70%-м етанолом протягом 15 хв, промивали проточною водою 30 хв та відповідно до схеми дослідження інкулювали водними суспензіями бульбочкових бактерій (10^9 клітин/мл) упродовж 60 хв. У посудині вирощували по 8 рослин в умовах 60%-ї вологості субстрату від повної вологості й за природного освітлення. Повторюваність у варіантах дослідження семиразова. Контролем слугували рослини, інкульовані бульбочковими бактеріями вихідного (батьківського) штаму 348а.

Ефективність симбіозу конюшини і Tn5-мутантів *R. leguminosarum* bv. *trifolii* оцінювали за кількістю, масою кореневих бульбо-

чок, їхньою азотфіксувальною активністю, а також показниками надземної маси і маси коренів рослин, накопиченням сухої речовини. Рослини для аналізу відбирали у фазі куціння, бутонізації та цвітіння. Нітрогеназну активність (азотфіксацію) визначали за рівнем ацетиленвідновлювальної активності бульбочок ацетиленовим методом Харді [30, 31] і виражали в мікромолях (або наномолях) етилену, який утворився бульбочками однієї рослини за 1 год (або 24 год). Газову суміш аналізували на газовому хроматографі Agilent Technologies 6855 Network GC System (визначення проводили у п'ятикратній повторюваності).

Статистичну обробку експериментальних даних виконували за Доспеховим [32] із застосуванням програми Microsoft Excel 2003. Для показника урожайності було використано показник НІР (найменша істотна різниця). У таблицях і на рисунках наведено середні арифметичні та їх стандартні похибки.

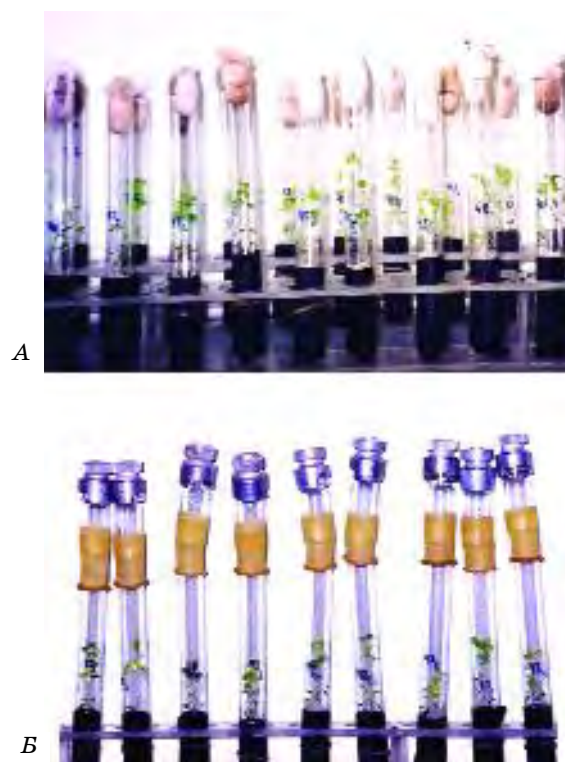


Рис. 1. Первинний скринінг Tn5-мутантів *R. leguminosarum* bv. *trifolii* за симбіотичними властивостями і Eff⁺-фенотипом рослин:

А — рослини конюшини в умовах стерильного лабораторного дослідження; Б — визначення азотфіксувальної активності бульбочок конюшини (інкубація рослин у середовищі зі вмістом ацетилену 10% від об'єму газової суміші)

Результати та обговорення

У результаті проведених експериментів з'ясовано, що штами бульбочкових бактерій *R. leguminosarum* bv. *trifolii* B₁(1000)NN, B₁(100)E, B₁(-10)E, 348a, 346, C10, 8St і 500 відрізняються за чутливістю до стрептоміцину і канаміцину (табл. 2). Найбільш придатними реципієнтами плазмиди pSUP2021::Tn5 були бактерії штамів 348a і 8St, чутливі до 25 мкг/мл канаміцину і резистентні до 300 мкг/мл стрептоміцину. Механізм стійкості бактерій полягає в ензиматичній інактивації антибіотика внаслідок аденілювання або фосфорилювання гідроксильної групи в положенні 3-метилглюкозаміну і визначається трансмісивним R-фактором. Зокрема, стрептоміцин пригнічує синтез протеїну в клітині, у результаті порушується функціонування 30S-субчастин рибосом, індукуються включення помилкових амінокислот до синтезованого поліпептидного ланцюга [23]. Концентрацію антибіотика в середовищі вирощування, за якої кількість бактеріальних колоній зменшувалась на 50% порівняно з їх кількістю на середовищі без антибіотиків, вважали мінімальною пригнічувальною (МПК). За бактеріостатичної дії стрептоміцин безповоротно з'єднується з рибосомами та інактивує їх, тому клітина перестає ділитись і розмножуватись [23]. Для штамів *R. leguminosarum* bv. *trifolii* B₁(1000)NN, 348a і 346 концентрація канаміцину 25 мкг/мл була МПК, а 50 — бактерицидною лише для штамів 348a і 8St. У бактеріальній популяції присутні окремі клітини, які внаслідок випадкових мутацій відрізняються за властивостями від батьківських клітин. Відмінності можуть виявлятися на біохімічному, морфологічному і куль-

туральному рівнях. Зазвичай бактеріальна популяція має клітини-мутанти, резистентні до менших концентрацій антибіотика, ніж МПК, але чутливі до більших. У результаті ступеневого відбору клітин ризобій, резистентних до більшої концентрації Str порівняно з основною популяцією, у штамів 348a і 8St відібрали компетентні клітини, резистентні до 800 мкг/мл Str, які потім використали як реципієнти плазмиди pSUP2021::Tn5.

У результаті кон'югації між *E. coli* S17-1 (pSUP2021::Tn5) і штамом *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348a отримано 103 інсерційні мутанти, резистентні до 200 мкг/мл канаміцину. У штаму 8St Tn5-мутантів одержати не вдалося. Частота виникнення Km^R-клітин дорівнювала $1,9 \cdot 10^{-7}$ (табл. 3).

В умовах мікровегетаційного дослідження симбіотичний фенотип кожного мутанта виявляли інокуляцією насіння конюшини транспозоновим мутантом і спостереженням за ростом рослин та відновленням ацетилену (рис. 1, А, Б). Цілеспрямовано зі 103 проаналізованих відібрано 11 Tn5-мутантів *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, які зумовлювали позитивну реакцію (понад 10% від фенотипу вихідного штаму 348a) стосовно як росту рослин, так і відновлення ацетилену.

За інокуляції конюшини мутантами кількість бульбочок збільшилась на 12,7–118,2%, азотфіксувальна активність — на 13,7–85,8%, надземна маса рослин — на 20,6–40,3% порівняно з показниками рослин, інокульованих штамом-стандартом 348a (табл. 4). Одночасне збільшення показників нодуляції, азотфіксувальної активності і ефективності відзначено тільки в окремих варіантах дослідження. Нерідко рослини з активно фіксуючими атмосферний азот бульбочками посту-

Таблиця 2. Інтенсивність росту бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* на мінеральному синтетичному середовищі 79, збагаченому антибіотиками

Штам	Середовище 79 б/а	Вміст антибіотика у мінеральному живильному середовищі 79, мкг/мл										
		Km					Str					
		10	25	50	75	100	50	100	300	500	750	1000
B ₁ (1000)NN	++++	++++	++	++	—	—	++++	++++	++++	++++	++++	++++
B ₁ (-10)E	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—	—
C-10	++++	++++	++++	+++	—	—	+++	+++	+++	—	—	—
348a	++++	++++	++	+	—	—	++++	++++	++++	++++	++++	++
346	++++	++++	++++	++	—	—	+++	+++	+++	—	—	—
8St	++++	++++	++	—	—	—	++++	+++	+++	—	—	—
24GR	++++	++++	++++	++++	++	+	++++	++++	++++	+++	+++	++
500	++++	++++	++++	++++	+++	+	++	—	—	—	—	—

Примітка. Інтенсивність росту бульбочкових бактерій: «++++» — на рівні контролю; «+++» — дещо слабший; «++» — дуже слабкий; «+» — ледве помітний; «—» — відсутній.

Таблиця 3. Тп5-мутагенез бульбочкових бактерій *R. leguminosarum* bv. *trifolii* з використанням штаму-донора

Штам-реципієнт	Штам-донор	Чутливість до Km, мкг/мл	Стійкість до Str, мкг/мл		t, год	A	B	V	Кількість Km ^R -мутантів
						Розведення			
						вихідне, 0	х, 7		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 348a	E. coli S17-1 (pSUP2021::Tn5)	30	300	800	6	60,5±2,5	31,7±1,6	1,89·10 ⁻⁷	103
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 8St	E. coli S17-1 (pSUP2021::Tn5)	30	300	800	6	0	16,5±1,0	0	0

Примітка. t — час експозиції зі штамом-донором, год; А — кількість Km^R клітин на МДА+Km+Str; В — кількість клітин на МДА+Str (загальна кількість ризобій); V — частота транспозиції (появи Km^R-мутантів).

Таблиця 4. Симбіотичні властивості Тп5-мутантів штаму *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 348a (мікровегетаційний дослід)

Варіант	Кількість бульбочок		Азотфіксувальна активність		Надземна маса рослини	
	шт. / рослині	%	нмоль C ₂ H ₄ / (рослину·24год)	%	мг	%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 348a	5,5±0,3	100,0	165,42±12,40	100,0	38,83±1,62	100,0
T1к	6,2±0,4	112,7	188,03±20,15	113,7	50,50±5,40	130,0
T2к	7,9±0,3	143,6	291,80±17,20	176,4	52,00±2,95	133,9
T25	5,6±0,2	101,2	200,41±16,00	121,2	46,83±2,65	120,6
T28к	9,0±0,6	163,4	307,43±23,61	185,8	54,50±2,27	140,3
T29к	7,0±0,2	127,3	242,17±16,20	146,4	38,66±1,92	99,6
T38к	5,5±0,4	100,0	136,64±11,23	82,6	47,83±2,83	123,2
T40к	6,3±0,5	114,5	189,20±12,35	114,4	48,00±5,20	123,6
T42к	7,4±0,3	134,5	173,15±10,36	104,7	47,66±3,52	122,7
T53к	9,0±8,5	163,6	148,15±15,32	99,6	35,50±3,64	91,4
T86к	11,2±0,3	203,6	174,12±17,82	105,3	40,83±2,65	105,2
T72к	12,0±0,4	218,2	278,75±20,10	168,5	52,33±2,76	134,8

палися за надземною масою рослинам із меншою інтенсивністю азотфіксації. Збільшення кількості та маси кореневих бульбочок іноді не супроводжувалося адекватним зростанням загальної азотфіксувальної активності. Відомо, що внаслідок застосування мутагенезу і гібридизації до бульбочкових бактерій, клітини (штами) з одночасним посиленням азотфіксувальної активності й ефективності виникають рідко, проте їх можна отримати шляхом ступеневого відбору [28].

В умовах вегетаційного дослідження продовжували вивчати властивості 5 Тп5-мутантів (із 11 відібраних): Т2к, Т28к, Т29к, Т40к, Т72к *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, що домінували над вихідним штамом 348а за симбіотичним фенотипом в умовах мікровегетаційного дослідження (рис. 2). Симбіотичні показники макросистеми досліджували в динаміці у період основних фаз розвитку конюшини. Встановлено, що вже під час фази куштиння формується симбіотичний апарат, який істотно відрізняється за інтенсивністю

фіксації азоту залежно від генотипу бульбочкових бактерій. Три мікросимбіоти — 348а, Т28к і Т72к — виявились однаковою мірою вірулентними і суттєво домінували над рештою мутантів за кількістю ініційованих бульбочок на коренях рослин (рис. 3, А) упродовж фаз куштиння та бутонізації конюшини. Однак, вже у фазі цвітіння у рослин, інокульованих Тп5-мутантами Т2к, Т28к і Т72к, кількість симбіотичних органів збільшилась в 1,4–1,7 раза (рис. 3, А) й істотно домінувала за масою порівняно із симбіотичним фенотипом штаму 348а (рис. 3, В).

Активні Тп5-мутанти *R. leguminosarum* bv. *trifolii* впливали на перебіг асиміляційних процесів у симбіотичних системах конюшини і тією чи іншою мірою змінювали їхню інтенсивність. Тп5-мутанти Т2к і Т28к перевищували за азотфіксувальною активністю контроль в 1,5 раза у фазі бутонізації і в 2,3 і 2,8 раза відповідно під час початкового цвітіння конюшини (табл. 4). Нітрогеназна активність кореневих бульбочок за участю



Рис. 2. Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями на формування і функціонування симбіотичного апарату та ріст вегетативної маси (А, Б) рослин конюшини (вегетаційний дослід)

мутанта Т72к була більшою в 1,6 раза в ранній період функціонування симбіотичної системи — у фазі кущіння і в 2,4 раза — у фазі початку цвітіння конюшини порівняно з бульбочками, утвореними вихідним штамом 348а. Упродовж усього періоду вегетації рослин найбільшою інтенсивністю відновлення N_2 характеризувалися симбіотичні системи конюшини, утворені за участю Тп5-мутантів *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Т28к та Т72к (табл. 5).

В умовах вегетаційного дослідження передпосівна інокуляція насіння конюшини трьома мутантами — Т2к, Т28к і Т72к — забезпечувала збільшення зеленої маси на

29,6–41,8% (рис. 3, В), а маси коренів — в 1,4 і 1,7 раза (рис. 3, Д) порівняно з контрольними рослинами. Результати проведених експериментів дають змогу зробити висновки про перевагу бактеризації конюшини Тп5-мутантами Т28к і Т72к порівняно з іншими залученими для інокуляції ризобіями, а також вихідним штамом 348а.

За даними літератури, в період бутонізації–початку цвітіння у зеленій масі бобових трав, зокрема конюшини, синтезується значний вміст сухої речовини та нагромаджується максимальна кількість протеїну. Очевидно, в цей період за оптимальних умов симбіозу досягають максимуму показники кількості та

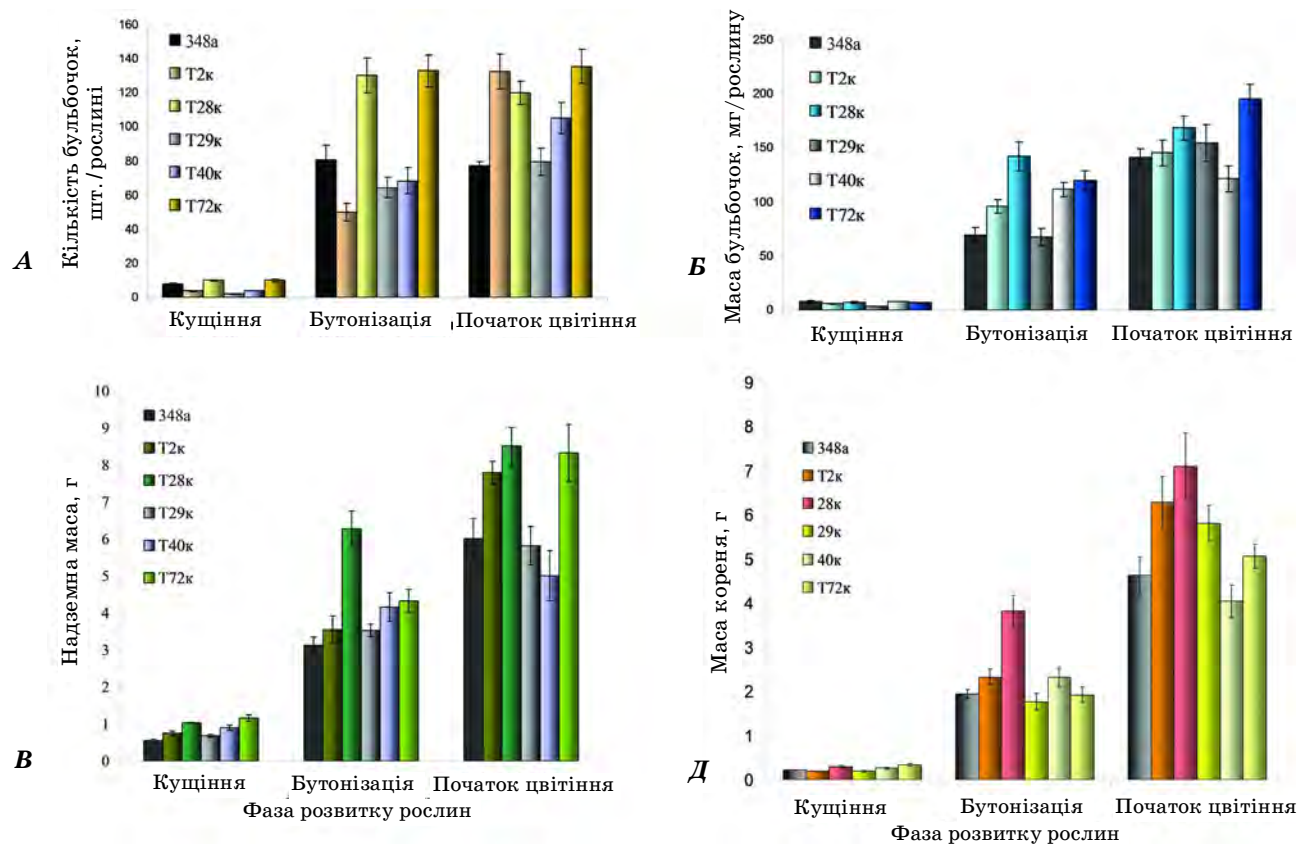


Рис. 3. Динаміка наростання кількості (А), маси бульбочок (Б), надземної маси (В) і маси коренів (Д) конюшини, інокульованої Тп5-мутантами *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348а (вегетаційний дослід)

Таблиця 5. Азотфіксувальна активність і врожай сухої надземної маси конюшини, інокульованої Tn5-мутантами *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Варіант	Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 / (рослину · год)			Урожай, г/посудину			
	кущіння	бутонізація	початок цвітіння	I укіс	II укіс	сумарний	%
Штам 348а	0,44±0,03	1,42±0,06	1,82±0,12	12,7	10,9	23,6	100
Tn5-мутанти штаму <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 348а							
T2к	0,24±0,03	2,19±0,19	4,20±0,34	14,3	12,2	26,6*	112,7
T28к	0,40±0,04	2,22±0,62	5,13±0,68	14,7	11,9	26,6*	112,7
T29к	0,08±0,01	0,85±0,06	2,53±0,18	11,7	10,9	22,5	95,2
T40к	0,17±0,01	1,62±0,17	2,96±0,27	12,8	10,8	23,6	99,6
T72к	0,70±0,10	1,82±0,15	4,42±0,41	14,3	13,7	27,9*	118,2
НІР _{0,05}				1,4	1,0		

Примітка. * — Різниця достовірна порівняно з інокуляцією конюшини штамом *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 348а.

маси бульбочок, а також азотфіксувальної активності, що сприяє оптимальному синтезу протеїну. Беручи це до уваги, ми провели два укуси зеленої маси конюшини: перший — у фазі початку цвітіння, другий — у цій самій фазі після відновлення вегетативного росту надземних органів після скошування. Результати обліку надземної маси свідчать, що після першого скошування відростання вегетативних органів відбувається значно повільніше, а отже й меншим є урожай другого укусу конюшини. У підсумку з рослин, інокульованих мутантами T2к, T28к і T72к, за два укуси зібрали відповідно на 12,3, 12,8 та 18,2% більше врожаю повітряно-сухої надземної маси порівняно з рослинами, інокульованими штамом 348а (табл. 5), що вказує на ефективність функціонування симбіотичної системи конюшина — Tn5-мутанти *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

У зв'язку з тим, що нові активні Tn5-мутанти є цінним селекційно-генетичним матеріалом, постала необхідність молекулярного аналізу їхнього геному на наявність транспозона. Для дослідження мутантів ризобій конюшини застосували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Як маркер відбору Tn5-мутантів за транспозонового мутагенезу бульбочкових бактерій конюшини використовували ген стійкості до канаміцину. Для контролю було взято штами *E. coli* S17-1(pSUP2021::Tn5) — позитивний контроль та *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348а — негативний контроль.

Результати ПЛР свідчать, що вихідний штам-реципієнт *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348а не містить у геномі фрагмента ДНК гена стійкості до канаміцину транспозона Tn5 (рис. 4).

Водночас аналіз ПЛР показав наявність цього фрагмента транспозона завдовжки

517 нуклеотидних пар у Tn5-мутантів бульбочкових бактерій конюшини T2к і T72к. Це свідчить про інтеграцію в їхній геном нуклеотидної послідовності гена неоміцинфосфотрансферази, що зумовлює стійкість до канаміцину, тобто вони дійсно є Tn5-мутантами.

Отже, унаслідок транспозонового мутагенезу штаму 348а та цілеспрямованого селективного відбору за підвищеними симбіотичними показниками отримано високоактивні Tn5-мутанти *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T2к, T28к і T72к, які є перспективними за комплексом господарсько-цінних властивостей. У результаті інокуляції конюшини цими Tn5-мутантами утворюється більша маса кореневих бульбочок, підвищується інтенсивність азотфіксації, посилюється вегетативний ріст, збільшується урожайність надземної маси рослин та синтезується більше сухої речовини порівняно з інокуляцією рослин виробничим штамом 348а *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

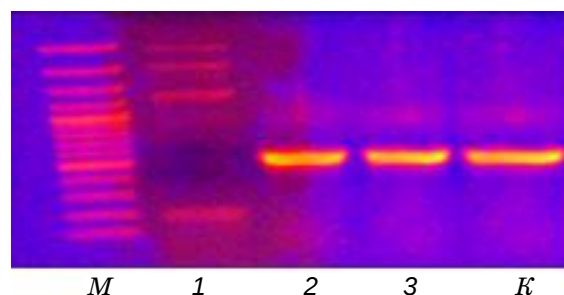


Рис. 4. Електрофорез в 0,7%-му агарозному гелі продуктів ПЛР-ампліфікації ДНК бульбочкових бактерій конюшини (1–3) та *E. coli* S17-1 (К) з використанням праймерів до гена неоміцинфосфотрансферази Tn5:

1 — вихідний штам 348а, Tn5-мутанти штаму 348а: 2 — T2к; 3 — T72к; М — маркер молекулярної маси

ЛІТЕРАТУРА

1. Коць С. Я., Михалків Л. М. Фізіологія симбіозу та азотне живлення люцерни. — К.: Логос, 2005. — 300 с.
2. Коць С. Я., Петерсон Н. В. Мінеральні елементи і добрива в живленні рослин. — К.: Логос, 2005. — 150 с.
3. Патики В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот / Під ред. В. Т. Патики. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
4. Коць С. Я. Роль біологічного азоту у підвищенні продуктивності сільськогосподарських рослин // Физиол. биохим. культ. раст. — 2001. — Т. 33, № 3. — С. 208–215.
5. Новичкова Н. С., Кузнецова Л. Г., Шевелева Е. В. и др. Рост и фотосинтез клевера в отсутствии связанного азота // Там же. — 1991. — Т. 23, № 2. — С. 130–137.
6. Вахитова Л. Ф., Валиахметова Ю. З. Симбиотическая фиксация азота клевером луговым на черноземах северной лесостепи Зауралья / Проблемы агр. сектора Южн. Урала и пути их решения. — Челябинск: ЧГАУ, 2006. — С. 139–143.
7. Патыка В. Ф., Толкачев Н. З., Бутвина Ю. З. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современном земледелии Украины // Физиол. биохим. культ. раст. — 2005. — Т. 37, № 5. — С. 384–393.
8. Антупчук А. Ф. Экологические аспекты селекции ризобий и повышение эффективности симбиоза // Там же. — 1994. — Т. 26, № 4. — С. 315–333.
9. Prevost D., Bromfield E. S. P. Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils // Can. J. Soil Sci. — 2003. — V. 83, N 3. — P. 311–319.
10. Simon T. New *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates: Collection, identification and screening of efficiency in symbiosis with clover // Plant Soil Envir. — 2006. — V. 52, N 3. — P. 105–110.
11. Гамолин А. А., Темпер Э. Е. Характеристика мутантных форм *Rhizobium japonicum* / Науч.-тех. бюл. Всерос. НИИ сои. — 1984. — № 13–14. — С. 37–43.
12. Фёдоров С. Н. Получение мутантов клубеньковых бактерий люцерны с изменёнными симбиотическими свойствами под действием УФ-излучения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1987. — 16 с.
13. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Спайнка Г., Кондороши А., Хукаса П. — Рус. перевод под ред. Тихоновича И. А., Проворова Н. А. — СПб., 2002. — 567 с.
15. Онищук О. П., Курчак О. Н., Шарипова Л. А. и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // Генетика. — 2001. — Т. 37, № 11. — С. 1266–1271.
16. Мандровська Н. М., Кругова О. Д., Коць С. Я. Ефективність симбіозу рослин гороху із транспозантами *R. leguminosarum* bv. *viciae* 2636 // Вісн. Харків. нац. агр. ун-ту. Серія біологія. — 2007. — Вип. 1 (10). — С. 65–70.
17. Karr D. B., Rong-Ti L., Reuhs B. L., Emerich D. W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation // Planta. — 2000. — V. 211. — P. 218–226.
18. Mills D. Transposon mutagenesis and its potencial for studying virulence genes in plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. — 1985. — V. 23. — P. 297–320.
19. Маліченко С. М., Даценко В. К., Василюк В. М. Транспозоновий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2007. — Т. 39, № 5. — С. 409–418.
20. Затовская Т. В., Шарыпова Л. А., Селиверстова Е. В., Симаров Б. В. Мутант Tr63 по гену *tolC* штамма СХМ1-188 *Sinorhizobium meliloti* не способен к формированию эффективного симбиоза с люцерной // Генетика. — 2007. — Т. 43, № 3. — С. 323–332.
21. Воробей Н. А., Коць С. Я., Маліченко С. М., Якимчук Р. А. Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиол. биохим. культ. раст. — 2006. — Т. 38, № 5. — С. 418–426.
22. Simon R., Priefer U., Puhler A. A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Biotechnology. — 1983. — V. 1. — P. 784–791.
23. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибіотики / Пер. с англ. Ю. В. Дудника. — М.: Мир, 1985. — 265 с.
24. Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. — Cold Spring Harbor Lab. Press, 1998.
25. Simon R., O'Connel M., Labes M., Puhler A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulations of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria // Meth. Enzymol. / Academic Press Inc. — 1986. — V. 118. — P. 640–659.
26. Chachaty E., Saulnier P. Isolation chromosomal DNA from bacteria / Nucleic Acid Protocols Handbook (Edited by R. Rapley). — Humana Press Inc., Totowa NJ, 2000. — P. 29–32.
27. Reznikoff W. S. Transposon Tn5 // Annu. Rev. Genet. — 2008. — V. 42. — P. 151–158.
28. Фёдоров С. Н., Фокина И. Г., Симаров Б. В. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны в лабораторных условиях // С.-х. биол. — 1986. — № 1. — С. 112–118.
29. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. — К.: Наук. думка, 1964. — 388 с.

30. Крикунець В. М. Ацетиленвідновний метод у дослідженнях з фізіології бобово-ризобіального симбіозу // Физиол. биохим. культ. раст. — 1993. — Т. 25, № 5. — С. 419–430.
31. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene–ethylene assay for

- N_2 -fixation: Laboratory and field evaluation // Plant Physiol. — 1968. — V. 43, N 8. — P. 1185–1207.
32. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 352 с.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ
ЭФФЕКТИВНЫХ Tn5-МУТАНТОВ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ КЛЕВЕРА**
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii*

Н. А. Воробей¹
В. М. Заец²
С. Я. Коць¹

¹Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Киев

²Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: n-vorobey@ukr.net

С помощью плазмидного вектора pSUP2021::Tn5 осуществлен мутагенез штамма 348a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Частота образования Km^R-мутантов при перенесении этого вектора из *Escherichia coli* в *Rhizobium* составляла $1,9 \cdot 10^{-7}$. Инсерционная природа полученных мутантов установлена при использовании полимеразной цепной реакции. За симбиотическими показателями и Eff⁺⁺-фенотипом растений клевера в условиях микроvegetационного и вегетационного опытов проведен скрининг Tn5-мутантов и отображены ризобии с повышенным синтезом нитрогеназы и хозяйственно-ценными свойствами. Tn5-мутанты T2k, T28k, T72k существенно превосходили остальные ризобии за нодуляционной активностью. В фазе цветения клевера на корнях растений при их участии образовалось в 1,4–1,7 раза больше клубеньков, доминирующих за массой. При усилении ризогенеза надземная масса растений увеличилась на 29,6–41,8%. Интенсификация физиологических процессов у клевера обеспечивалась увеличением нитрогеназной активности симбиотического аппарата, которая в фазе цветения превосходила в среднем в 2,5 раза показатели растений, инокулированных исходным (родительским) штаммом 348a. Полученные данные указывают на возможность создания высокоэффективных симбиотических систем клевер — Tn5-мутанты *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Ключевые слова: транспозоновый мутагенез, Tn5-мутанты, полимеразная цепная реакция, клевер, симбиоз, азотфиксирующая активность, эффективность.

**BIOTECHNOLOGY OF EFFECTIVE
Tn5-MUTANTS CREATION OF CLOVER
NODULE BACTERIA**
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii*

N. A. Vorobey¹
V. M. Zayets²
S. Ya. Kots¹

¹Institute of Plant Physiology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Institute of Molecular Biology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: n-vorobey@ukr.net

Plasmid vector pSUP2021::Tn5 for transposon mutagenesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 348a was used. The frequency of Km^R-mutants formation after transfer this vector from *Escherichia coli* to *Rhizobium* was $1,9 \cdot 10^{-7}$. The presence of Tn5 in mutants DNA was verified using polymerase chain reaction. By the symbiotic traits and Eff⁺⁺-phenotype of clover plants the Tn5-mutants strains were screened in vegetative and field conditions and rhizobia with increased synthesis of nitrogenase and economical valuable properties were selected. Tn5-mutants T2k, T28k, T72k were significantly higher than other rhizobia by the nodulation activity. In the phase of clover flowering on roots of plants through their involvement it was formed 1.4–1.7 times as much nodules which dominated by mass. Aboveground plant weight increased by 29,6–41,8% at strengthening ryzogenesis. Intensification of physiological processes in clover ensured by increase of nitrogenase activity of symbiotic system which in the early flowering phase exceeded at an average of 2.5 times the results of plants inoculated by the original (parent) strain 348a. Obtained data indicate the possibility of creating highly efficient symbiotic systems clover — Tn5-mutants *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Key words: transposone mutagenesis, Tn5-mutants, polymerase chain reaction, clover, symbiosis, nitrogen-fixing activity, efficiency.