

Literature and personal researches data present that demonstrate modern achievements of maize genetic resources studying. It shows necessity of DNA-technologies using for biovariety definition and safe, in particular, methods on basis of polymerase chain reaction.

**КОЦЬ С.Я.<sup>1</sup>, МАЛЧЕНКО С.М.<sup>1</sup>, ДАЦЕНКО В.К.<sup>1</sup>, МАМЕНКО П.М.<sup>1</sup>,  
ЯКИМЧУК Р.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

вул. Васильківська, 31/17, м.Київ, Україна

<sup>2</sup>Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини

вул. Садова, 2, м.Умань, Україна

### **Tn5-МУТАНТИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*: ОТРИМАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХНІХ ВЛАСТИВОСТЕЙ**

Для одержання оптимальних врожаїв зернобобових культур і багаторічних та однорічних бобових трав необхідно поряд із впровадженням високопродуктивних сортів цих рослин застосовувати також для їх передпосівної інокуляції вірулентні, конкурентоспроможні і активні штами відповідних бульбочкових бактерій, здатні утворювати з ними ефективний азотфіксувальний симбіоз.

Із метою отримання перспективних для застосування в сільськогосподарській практиці ризобіальних штамів поряд із класичним методом аналітичної селекції, тобто виділенням і відбором ризобій безпосередньо із корневих бульбочок або з ґрунту, фізичним та хімічним мутагенезом, до останнього часу активно застосовувались методи генетичної інженерії. Спочатку це були методи трансформації і трансдукції, проте через незначну частоту появи мутантів із зміненими симбіотичними властивостями ними перестали користуватись у селекційній практиці [1].

Одним із найефективніших методів отримання нових високоактивних штамів бульбочкових бактерій нині є метод транспозонового мутагенезу, який полягає у здатності рухомих генетичних елементів – транспозонів вбудовуватися в ген-мішень, інактивувати його і мітити маркером стійкості до певних антибіотиків, викликаючи при цьому поодинокі генетичні зміни [4].

При вивченні генетики бульбочкових бактерій досить часто застосовують транспозон Tn5, який має здатність різною мірою проникати в геном окремих ризобіальних видів і штамів, кодуючи при цьому їх стійкість до канаміцину та неоміцину.

Цей транспозон може вбудовуватися в будь-яку точку геному ризобій і викликати в них різні мутації. Для транспозонового мутагенезу використовують плазмідні вектори, до складу яких входить транспозон Tn5. Дані вектори можуть реплікуватися в клітинах *Escherichia coli*, але не в ризобіальних клітинах. Після кон'югаційного перенесення з *E.coli* в ризобію плазміда елімінується, а транспозон включається в геном бульбочкових бактерій з частотою  $10^{-5}$  –  $10^{-7}$  на клітину, надаючи їм стійкість до певних антибіотиків.

Таким чином, при застосуванні транспозонів у дослідженнях із бульбочковими бактеріями можна мітити гени, що не мають самостійного фенотипового прояву і тим самим уможливити проведення їх генетичного аналізу і первинного скринінгу мутантів зі зміненими симбіотичними властивостями.

На сьогодні переважна більшість робіт із Tn5-мутагенезу бульбочкових бактерій виконана з використанням швидкорослих ризобій. Одним із завдань нашої роботи було встановлення можливості використання вектора pSUP2021::Tn5 для проведення

транспозонового мутагенезу повільнорослих бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*.

### **Матеріали і методи**

Культуру штаму *E.coli* S17-1 – донора транспозона Tn5 і культури штамів-реципієнтів *B. japonicum* вирощували до пізньої логарифмічної фази росту, після чого готували їх кон'югативну суміш із розрахунку 1:5, яку потім висівали на агаризоване поживне середовище ТУ [3]. Через 20 або 30 год росту при 28°C кон'югаційну суміш бактерій змивали стерильною водопровідною водою, готували послідовно 10-, 100-, 1000- і т.д. розбавлення, які висівали на селективне манітно-дріжджове агаризоване середовище (МДА) з 200 мкг/мл канаміцину і 600 мкг/мл стрептоміцину [2]. Вирослі на такому середовищі колонії бактеріальних культур були транспозоновими мутантами бульбочкових бактерій. Частота транспозиції при цьому складала  $10^{-6}$  на клітину. Колонії відсівали на пробірки з агаризованим середовищем і зберігали для подальших досліджень їх симбіотичних властивостей.

### **Результати і обговорення**

Зважаючи на існуючу в літературі думку, що найменш стабільною ознакою бактерій є їх стійкість до антибіотиків, ми вирішили перевірити здатність Tn5-мутантів штаму *B. japonicum* 646 зберігати набуту при мутагенезі властивість рости на середовищі з 200 мкг/мл Km. Спершу цю стабільність перевіряли через 7 місяців після отримання даних культур. У результаті виявилось, що всі 76 перевірених Tn5-мутантів добре росли на МДА + 200 мкг/мл Km. Інтенсивність їх росту на цьому селективному середовищі була такою ж, як і на контролі (МДА без антибіотика). Однак після зберігання впродовж 4-х років в умовах музею цілий ряд Tn5-мутантів втратили резистентність до Km, а деякі інші якщо і були здатні рости в присутності цього антибіотика, то при його концентрації 200 мкг/мл їм був притаманний ледь помітний ріст. При цьому мутантів, які за інтенсивністю росту на МДА + 200 мкг/мл Km не відрізнялись від росту на контролі, було лише 20 із 86-ти перевірених (22,7%), 11 культур росли на середовищі з Km дещо слабше, а 9 Tn5-мутантів за цих умов росли дуже слабко. Решта 45 мутантів повністю втратили здатність рости на середовищі з 200 мкг/мл Km. Викладене свідчить, що Tn5-мутанти соєвих ризобій при тривалому зберіганні в умовах музею можуть втрачати набуту при мутагенезі резистентність до Km.

Одержаним у результаті транспозонового мутагенезу мутантам притаманні різноманітні фізіологічні і симбіотичні властивості, у зв'язку з чим необхідно проводити відбір цих мутантів за певними господарсько-цінними ознаками. Первинний скринінг за ознаками «інтенсивність азотфіксації», «вірулентність» та «ефективність симбіозу» ми здійснювали в умовах мікровегетаційного і вегетаційного дослідів, у яких проаналізовано понад 150 Tn5-мутантів штаму 646 *B. japonicum*.

Виявлено, що в мікровегетаційних дослідах перші кореневі бульбочки утворювались через 3 тижні після появи сходів як у контролі (інокуляція вихідним штамом *B. japonicum* 646 або штамом-стандартом 634б), так і у варіанті з інокуляцією сої Tn5-мутантами. Аналізуючи результати мікровегетаційних дослідів встановлено, що за симбіотичними властивостями більшість перевірених канаміцинрезистентних рекомбінантів незначною мірою відрізнялася від вихідного штаму 646 і штаму-стандарту 634б. Проте, окремі з них за вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, їх розміщенням на корінні сої, ацетиленвідновлювальною активністю та накопиченням вегетативної маси рослини-хазяїна перевищували контрольні штамми.

Подальші дослідження продовжили у вегетаційних та польових умовах. У результаті із контрастних за азотфіксувальною активністю і вірулентністю відібрано сім ризобіальних Tn5-мутантів, а саме мутанти 21-2, 9-1, 17-2, 35-2, 107, 113 і 118-8, які у вегетаційних умовах були використані для створення модельних симбіотичних систем із різним рівнем ефективності. Виявилось, що Tn5-мутанти 21-2, 9-1 і 17-2 за

вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, їх розташуванням на кореневій системі рослини-хазяїна і, щонайважливіше, азотфіксувальною активністю у різні фази вегетації сої перевищували контрольні штами. Проте виявлено також три культури – 107, 113 і 118-8, яким була характерна висока вірулентність і водночас низька азотфіксувальна активність.

Ефективність симбіотичних систем, створених за участю рослин сої і відібраних у вегетаційних дослідках Tn5-мутантів, яким за попередніми даними притаманна висока азотфіксувальна активність, була перевірена в умовах польового дослідження на сірому лісовому і темно-сірому опідзоленому ґрунтах. При цьому встановлено (таблиця), що інокуляція трьома відібраними Tn5-мутантами – 21-2, 17-2 і 9-1 достовірно збільшувала врожай сої на 15–23% у порівнянні з інокуляцією виробничим штамом 634б. Вони виявилися вірулентними й активними мікросимбіонтами сої. Отримані дані свідчать, що за комплексом симбіотичних ознак кращими серед перспективних Tn5-мутантів є 21-2 і 17-2.

Таблиця. Урожай сої, інокульованої Tn5-мутантами *V. japonicum* (польові дослідження),

Варіант	Урожай, ц/га				Приріст до виробничого штаму 634б	
	I	II	III	середнє	ц/га	%
Без інокуляції	15,9	17,6	15,8	16,4	– 4,2	– 20,4
<b>Штам</b>						
634б	21,5	22,2	18,2	20,6	–	–
646	20,8	22,7	19,3	20,9	+ 0,3	+ 1,5
<b>Tn5-мутант</b>						
9-2	24,8	26,4	19,8	23,7	+ 3,1	+ 15,0
17-2	26,4	28,2	20,0	24,9	+ 4,3	+ 20,9
21-2	26,3	28,1	21,9	25,4	+ 4,8	+ 23,3
HP <sub>0,05</sub>	2,1	2,2	2,0			

Примітка: I – 2006 р., Київська обл., II – 2006 р., Черкаська обл., III – 2007 р., Черкаська обл.

### Висновки

Одержані нами результати свідчать, що у повільнорослих бульбочкових бактерій сої при використанні вектора pSUP2021::Tn5 можна отримати канаміцинрезистентні мутанти зі зміненими симбіотичними властивостями, а саме, бульбочкоутворенням, азотфіксувальною активністю і ефективністю симбіозу.

Встановлено, що транспозоновий мутагенез є ефективним методом одержання нових штамів повільнорослих бульбочкових бактерій. Інокуляція сої активними Tn5-мутантами *V. japonicum* підвищує ефективність функціонування соєво-ризобіальних симбіотичних систем, збільшуючи при цьому продуктивність рослини-хазяїна. Після додаткової перевірки конкурентоспроможності і технологічності отримані транспозонові мутанти ризобій можуть бути рекомендовані як біологічна основа бактеріальних добрив під сою.

### Література

1. Новикова Н.И., Ситаров Б.В. Трансдукция у *Rhizobium meliloti* // Генетика. – 1984. – 20, № 4. – С. 542–548.
2. Новикова Н.И., Шарыпова Л.А., Ситаров Б.В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекулярная генетика. Микробиол. и вирусол. – 1986. – № 8. – С. 32–36.
3. Beringer J.E., Hoggan S.A., Johnston, A.W.B. Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R-plasmid-mediated recombination // J. Gen. Microbiol. – 1978. – 104 №1 – P. 201–207.

4. *Pobigaylo N., Wetter D., Szymczak S. et al.* Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – **72**, № 6. – P. 4329–4337.

#### **Резюме**

Доведена можливість отримання Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* зі зміненими симбіотичними властивостями при використанні вектора pSUP2021::Tn5. В умовах мікровегетаційного і вегетаційного дослідів здійснено їх первинний відбір за ознаками «азотфіксувальна активність», «вірулентність» і «ефективність симбіозу». Відібрані мутанти, контрастні за цими ознаками, перевірені в польових дослідах. Кращі з них після додаткових випробувань можуть бути рекомендовані для використання як біологічна основа бактеріальних добрив під сою.

Доказана возможность получения Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* с измененными симбиотическими свойствами при использовании вектора pSUP2021::Tn5. В условиях микровегетационных и вегетационных опытов осуществлен их первичный отбор по признакам «азотфиксирующая активность», «вирулентность» и «эффективность азотфиксации». Отобранные мутанты, контрастные по этим признакам, проверены в полевых опытах. Лучшие из них после дополнительных испытаний могут быть рекомендованы для использования в качестве биологической основы бактериальных удобрений под сою.

The obtaining possibility of Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with modified symbiotic characteristics under the use of pSUP2021::Tn5 vector was proved. The primary selection by “nitrogen fixing activity”, “virulence”, “nitrogen fixation efficiency” signs was performed in microvegetative and vegetative experiments. The selected mutants, contrasting by these signs were tested in field experiments. The ones which were showed to be the best after the additional investigation might be recommended as the biological grounds of bacterial fertilizers for soybean.

**КУЗЬМЕНКО О.Л., НЕГРУЦЬКА В.В., ПАЛЬЧИКОВСЬКА Л.Г.,  
КАРПОВА І.С., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,  
03143, Україна, Київ, вул. Заболотного, 150*

#### **ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ГЕНОМНОГО ФІНГЕРПРИНТИНГУ (REP-ПІР) ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ІНСЕРЦІЙНИХ МУТАНТІВ *BACILLUS SUBTILIS***

Геноми всіх організмів містять повторювані послідовності. Еукаріотичні геноми складаються з численних повторів, з яких найкраще охарактеризованими є повтори *Alu* родини. В геномі людини їхня частка складає від 3 до 6 % [1]. Члени цієї родини не є цілком ідентичними і здатні до переміщення за механізмом оберненої транскрипції, що дає змогу зарахувати їх до класу ретротранспозонів. *Alu*-повтори є короткими нуклеотидними послідовностями (біля 300 пн.), які містять в своєму складі промотор РНК-полімерази III, ехансероподібні структури тощо. За даними літератури їхня активація призводить до різноманітних хромосомних перебудов, генетичної нестабільності, що є однією з причин канцерогенезу [2, 3].

Прокаріотичні геноми також містять повторювані елементи. Серед них виділяють групу міжгенних некодуєчих повторюваних послідовностей розміром до 200 пн, що мають інтрацистронне розміщення.

Метод геномного фінгерпринтингу (Rep-PCR) базується на використанні праймерів, комплементарних до консервативних повторюваних послідовностей ДНК,