

МАНДРОВСЬКА Н.М., КРУГОВА О.Д., КОЦЬ С.Я.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна: 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: azot@ifrg.Kiev.ua

ГЕНЕТИЧНІ ОЗНАКИ І СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Tn5-МУТАНТА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEAE M₁

Отримання високоефективних штамів бульбочкових бактерій із використанням сучасних генно-інженерних методів є важливим резервом підвищення інтенсивності біологічної азотфіксації. Сьогодні, завдяки розвитку у світі методів молекулярної генетики, з'явилася реальна можливість направлено конструювання високоефективних і конкурентоспроможних штамів ризобій [2, 6, 7, 10, 12]. Одним із таких методів є транспозоновий мутагенез [1, 5]. Метод зіграв значну роль в експериментальних дослідженнях механізмів симбіозу та вивчення генів бульбочкових бактерій, що відповідають за ці процеси. За його допомогою були виявлені основні гени, які визначають азотфіксувальну активність, вірулентність ризобій, та гени, пов'язані з формуванням симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами [8]. Нині частіше всього використовують транспозон Tn5, що обумовлено високою частотою його інтеграції у геноми реципієнтних штамів мікроорганізмів, відсутністю специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК при транспозиції Tn5 та низькою частотою утворення його ревертантів. Для введення транспозону Tn5 у реципієнтні штами застосовують широке коло транспозоновмісних плазмід-самовбивць, які можуть кон'югативно переноситись від спеціальних штамів *E. coli* до широкого кола грам-негативних бактерій. Ці плазміди не здатні до реплікації у реципієнтних штамів, а тому можуть зберігатися при поділі клітин хазяїна. Транспозон же за рахунок ферменту транспозази, яка транскрибується та транслюється хазяїнськими ферментними системами, може інтегрувати в його геном і стабільно підтримуватися в наступних поколіннях [13, 14].

Метою наших досліджень було вивчення генетичних ознак та симбіотичних властивостей у отриманого нами Tn5-мутанта *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* M₁.

Матеріали і методи

Мутант *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* M₁ отримано у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України методом транспозонового мутагенезу із активного штаму бульбочкових бактерій гороху 263б [9] із використанням вектора від *E. coli* S 17 pSUP2021: Tn5 [4]. Для визначення наявності транспозона Tn5 у мутантного штаму ризобій гороху був застосований метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [5, 13]. Симбіотичні властивості Tn5-мутанта M₁ вивчали у вегетаційних і польових дослідах.

Вегетаційні досліди проводили на річковому піску, використовуючи посудини об'ємом 5 кг. Контролем був варіант із обробкою насіння гороху сорту Дамір 2 штамом-реципієнтом 263б, а також абсолютний контроль —

обробка насіння стерильною водою. Повторність досліду 5-кратна. У дослідах визначали азотфіксувальну активність бульбочок за редукцією ацетилену в етилен [11], ефективність симбіозу за приростом надземної маси і коріння та масою зерна на посудину; нодуляційну здатність — за кількістю утворених бульбочок на корені.

Польові досліди проводили у дослідному господарстві Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (сmt Глеваха Васильківського району Київської обл.) на світло-сірих опідзолених легко-суглинистих ґрунтах. Облікова площа ділянки 5 м², повторність досліду 4-х кратна, посів рендомізований. Азотні добрива не вносили. Схема польових дослідів включала варіант із інокуляцією насіння гороху сорту Камелот штамом-реципієнтом 263б, виробничим штамом 245а і Tn5-мутантом M₁. Контролем був варіант без інокуляції — насіння замочене у стерильній воді. У польових дослідах визначали вплив інокуляції різними штамми ризобій на урожай зерна гороху. Дані оброблені статистично [3].

Результати та обговорення

Для одержання мутантів методом транспозонового мутагенезу був обраний штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* 263б [9], який має високу стійкість до стрептоміцину (Str) і низьку — до канаміцину (Km). Цей штам схрещували зі штамом *E. coli* S17, трансформованого плазмідосамовбивцею pSUP2021:Tn5. У результаті мутагенезу були отримані канаміцинстійкі до 200 мкг/мл мутанти бульбочкових бактерій гороху. Одержані Tn5-мутанти досліджували спочатку у мікровегетаційних дослідах за ознакою підвищеної азотфіксувальної активності. Серед перевірених мутантів саме Tn5 M₁ мав таку ознаку. Із метою підтвердження, чи дійсно транспозон знаходиться у його геномі, був використаний метод полімеразної ланцюгової реакції [13]. Маркером відбору транспозонових мутантів слугував ген стійкості до канаміцину. Контролем були взяті штам-реципієнт 263б та штам *E. coli* S17, який містив плазмід у рSUP2021:Tn5. Нами встановлено, що контрольний штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* 263б не містить у своєму геномі фрагменту ДНК гена стійкості до Km транспозону (рис.).

У той час ПЛР аналіз показав наявність даного фрагмента довжиною 517 нуклеотидних пар у Tn5-мутанта ризобій гороху M₁. Це свідчить про наявність в його геномі гена неоміцинфосфаттрансферази, тобто він є Tn5-мутантом. Набута стійкість мутанта M₁ до канаміцину є результатом інтеграції в його геном транспозону Tn5.

Важливим показником при оцінці транспозонових мутантів бульбочкових бактерій гороху є нодуляційна і азотфіксувальна активність бульбочок. Як видно із даних табл. 1, у варіанті із інокуляцією рекомбінантним штамом M₁, утворилася значна кількість бульбочок — 53 шт/рослину. За показником азотфіксувальної активності цей Tn5-мутант майже у 1,7 рази перевищував штам-реципієнт.

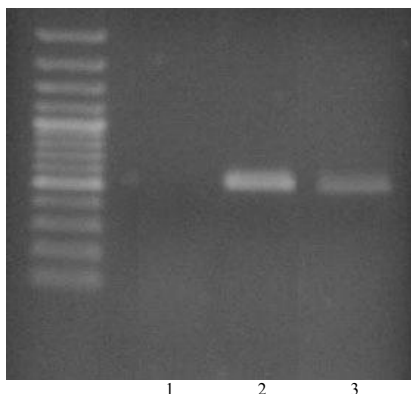


Рис. 1. Електрофорез в 0,7% агарозі продуктів ПЛР геномної ДНК бульбочкових бактерій гороху з праймерами на Tn5, що обмежують ділянку його гена стійкості до канаміцину довжиною 515 н.п. М — маркерна ДНК/ 1, 2, 3 — *Rh.leguminosarum* *bv. viciae*: 1 — вихідний штам 2636; 2 — транспозант M₁; 3 — *E. coli* S17-1, що містить плазмиду pSUP2021::Tn5

Таблиця 1

Симбіотичні властивості Tn5-мутанта M₁ *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* (вегетаційний дослід, фаза бутонізації — початку цвітіння)

Варіант	Кількість бульбочок, шт/рослину	Азотфіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(роsl-год)	Надземна маса, г/рослину	Маса кореня, г/рослину
Контроль без інокуляції	18,0 ± 1,3	1,52 ± 0,04	1,1 ± 0,02	0,98 ± 0,03
Штам-реципієнт 2636	27,0 ± 2,0	2,76 ± 0,08	1,5 ± 0,02	1,4 ± 0,09
Tn5-мутант M ₁	53,0 ± 4,0	4,58 ± 0,16	2,1 ± 0,01	1,7 ± 0,02

Відомо, що критеріями оцінки ефективності нових штамів ризобій є не тільки рівень ацетиленвідновної активності кореневих бульбочок, а й показники наростання біомаси рослин [2]. За надземною масою рослини, симбіотичні системи яких утворені за участю мутантного штаму M₁, перевищували рослини, інокульовані вихідним штамом на 14%, а за масою коріння — на 12%. Отримані дані свідчать, що Tn5-мутант M₁, який мав більш високий рівень азотфіксувальної активності, поліпшував азотне живлення рослин та сприяв збільшенню біомаси рослин.

Важливим показником в оцінці ефективності Tn5-мутантів є урожай зерна. У зв'язку з цим, ефективність нового Tn5-мутанта порівнювали не тільки із ефективністю вихідного, а й промислового штамів. За нашими даними (табл. 2 і 3), як у вегетаційному, так і польовому досліді, передпосівна обробка насіння гороху активним штамом бульбочкових бактерій і Tn5-му-

Таблиця 2

Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями на урожай зерна гороху (вегетаційний дослід)

Варіант	Середній урожай, г/посудину	Прибавка до контролю		Прибавка до шт. 263б	
		г/посудину	%	г/посудину	%
Контроль — без інокуляції	15,5 ± 0,2	—	—	—	—
Штам-реципієнт 263б	16,5 ± 0,1	1,0	6,5	—	—
Tn5-мутант M ₁	20,0 ± 0,1	4,5	29,0	3,5	21,2

Таблиця 3

Урожай зерна гороху при інокуляції штамми бульбочкових бактерій і Tn5-мутантом M₁ (польовий дослід)

Варіант	Середній урожай, ц/га	Прибавка до контролю		Прибавка до шт. 245а		Прибавка до шт. 263б	
		ц/га	%	ц/га	%	ц/га	%
Контроль — без інокуляції	27,6						
Виробничий штам 245а	33,9	6,3	22,8				
Штам-реципієнт 263б	34,6	7,0	25,3				
Tn5-мутант M ₁	39,8	12,2	44,3	5,9	1,4	5,2	15,0
НІР _{0,5}	2,2						

тантом M₁, сприяли підвищенню продуктивності гороху. Як видно із табл. 2, маса зерна гороху в умовах вегетаційного дослід у варіанті із інокуляцією мутантом M₁ на 21% перевищувала варіант із обробкою насіння штамом-реципієнтом.

Дані, наведені у табл. 3 свідчать, що прибавки урожаю зерна за інокуляції транспозоновими мутантами і активними штамми ризобій відносно контролю (спонтанна інокуляція) була достовірною в усіх варіантах дослід. У варіанті із інокуляцією новим штамом M₁ приріст урожаю становив 5,9 ц/га порівняно зі штамом 245а і 5,2 ц/га відносно штаму 263б.

Таким чином, одержаний мутант M₁ за сукупністю експериментальних даних перевищував штам-реципієнт 263б за симбіотичними властивостями та ефективністю симбіозу. За генетичними ознаками він відрізнявся від вихідного штаму наявністю в геномі фрагменту ДНК гена стійкості до канаміцину. Транспозоновий мутант M₁ депонований у депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і запатентований як високоефективний симбіонт гороху.

Література

1. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. Герман Спайк, Адам Кондорози, Пауль Лукас.— СПб.— 2002.— 568 с.
2. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Под ред. Б.В. Симарова.— Л.: Агропромиздат. 1990.— 190 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта.— М.: Агропромиздат, 1985.— 351 с.
4. Коць С.Я., Мандровська Н.М., Кругова О.Д. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* M₁ для одержання бактеріального добрива під горох. Патент України на винахід №81517, Бюл. №1, 2008 р.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир.— 1984.— С. 182–194.
6. Проворов Н.А., Симаров Б.В. Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью // Молекулярные механизмы генетических процессов.— М.— 1991.— С. 190–194.
7. Симаров Б.В., Тихонович И.А. Генетические основы бобово-ризобияльного симбиоза // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР.— М.: Наука.— 1985.— С. 165–174.
8. Симаров Б.В., Шарыпова А.А., Чеснокова О.Н. и др. Анализ Tn5-мутантов *R. meliloti* с повышенной симбиотической эффективностью // Генетика.— 1990.— 26, №4.— С. 636–639.
9. Старченков Ю.П., Мандровська Н.М., Нічик М.М., Кругова О.Д. та ін. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* для одержання бактеріальних добрив під горох. Пат. України на винахід №21012, 1997 р. Бюл. №1, 1998.
10. Biotechnical Inter (Cambridge) begins field of genetically engineer bacteria // Appl. Genet. News.— 1988.— V.8, №10.— P. 12–14.
11. Hardy R.W.F., Holsten F.D., Jackson E.K et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and evaluation // Plant Physiol.— 1968.— V.42, №8.— P. 1185–1207.
12. Mansanto (St. Louis Mo) reveals successful field test of genetically engineer microba // Appl. Genet. News — 1988.— V.8, №8.— P. 12–13.
13. Reznikoff W.S. The transposon Tn5 // Annu. Rev. Genet.— 2008.— V.42.— P. 151–158.
14. Simon By R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria // Methods in Enzymology.— 1986.— V.118.— P. 645–659.

Резюме

Одержаний Tn5-мутант M₁ перевищував штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 2636 за симбіотичними властивостями і ефективністю симбіозу. Встановлено, що за генетичними ознаками він відрізняється від вихідного штаму наявністю в геномі фрагменту ДНК гена стійкості до канаміцину. Транспозоновий мутант M₁ депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і запатентований як високоефективний симбіонт гороху.

Полученный Tn5-мутант M₁ превосходил штам-реципиент *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 2636 по симбиотическим показателям и эффективности симбиоза. Установлено, что по генетическим признакам он отличается от исходного штамма наличием в его геноме фрагмента ДНК гена устойчивости к канамицину.

Транспозоновый мутант M_1 депонирован в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии Д.К. Заболотного НАН Украины и запатентован как высокоэффективный симбионт гороха.

Obtained Tn5 mutant M_1 outdid the recipient strain of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* 263в in respect to the symbiotic peculiarities and symbiosis effectivity. It was established that the Tn5 mutant was different from the recipient strain by genetic signs such as the presence kanamicine resistance gene part. The mutant M_1 have been placed to the Depositarium of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine as well as have got the patent as high effective pea symbiont.

¹СМОЛИКОВА (АЛЕКСЕЙЧУК) Г.Н., ²СЛИВИНСКАЯ Э., ³ТЭЙЛОР А.

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: aleks.galina@gmail.com

² Университет технологии и наук о жизни, лаборатория генетики и селекции растений, Быдгошч, Польша

³ Корнельский университет, сельскохозяйственная экспериментальная станция штата Нью-Йорк, США

АНАЛИЗ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН КЛЕЩЕВИНЫ



Клещевина (*Ricinus communis* L.) принадлежит к семейству молочайных и представляет собой однолетнее растение, цветки которого собраны в соцветие типа кисть, плод — коробочка. Традиционно клещевину культивируют ради касторового масла, содержание масла в семенах колеблется от 48 до 60% в зависимости от сорта и района возделывания растения. Важное хозяйственное значение касторового масла связано с его уникальными свойствами: оно не высыхает, является самым плотным и вязким из всех растительных масел, застывает при температуре -18°C и ниже, растворяется в спирте, но не растворяется в нефти, бензине, при сгорании не оставляет остатка. Благодаря этим свойствам касторовое масло уже давно используется как лучшее, почти незаменимое смазочное масло в авиации, в ракетных двигателях, точных приборах, а также в качестве тормозной жидкости и трансформаторного масла. Наибольшие площади клещевины сосредоточены в Индии, Бразилии, США и Китае. Небольшие площади также имеются в Судане, Эфиопии, Анголе, Эквадоре. В СССР клещевину возделывали в Краснодарском крае и на Украине. Однако после распада СССР посевы клещевины в России и Украине значительно сокращены и сейчас эти страны полностью зависят от импорта касторового масла.