

ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ Tn5-МУТАНТІВ РИЗОБІЙ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ДОБРІВ

Коць С.Я., Маліченко С.М., Маменко П.М., Дрозденко Г.М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна
E-mail: mamenko@ifrg.kiev.ua

За допомогою штаму Escherichia coli S17-1 із вбудованою в нього плазмідною рSUP2021::Tn5 здійснено транспозоновий мутагенез штамів 646, 614a і 71m Bradyrhizobium japonicum. Найвища частота утворення канаміцинрезистентних мутантів складала 10^{-6} (B. japonicum 646). Із-поміж 1500 одержаних мутантів відібрано кращі за ознаками “вірулентність”, “азотфіксувальна активність” і “ефективність симбіозу”. Незважаючи на різні симбіотичні характеристики відібраних Tn5-мутантів, суттєвих відмінностей у їхньому білковому складі не виявлено. Зроблено висновок про можливість одержання повільнорослих ризобій за допомогою транспозонового мутагенезу.

Ключові слова: транспозоновий мутагенез ризобій, соя, симбіоз, азотфіксація.

Серед заходів поліпшення азотного живлення рослин особливе місце належить теоретичним і практичним розробкам, спрямованим на суттєве підвищення існуючого рівня біологічного перетворення молекулярного азоту в органічні азотовмісні сполуки мікроорганізмами-азотфіксаторами. Інтенсивність процесу симбіотичної фіксації азоту атмосфери визначається взаємодією макро- і мікросимбіонтів [6]. Ефективність симбіозу істотно залежить від добору сортів вирощуваних бобових рослин і комплементарних їм активних штамів бульбочкових бактерій [3].

Тривалий час одним із способів підвищення інтенсивності симбіотичної азотфіксації була аналітична селекція активних штамів бульбочкових бактерій із природних популяцій [1]. Сьогодні, завдяки застосуванню нових біотехнологічних підходів, у тому числі, методів молекулярної генетики і генної інженерії мікроорганізмів, з'явилася реальна можливість прискороного

конструювання високоефективних штамів бульбочкових бактерій. Одним із таких методів є транспозоновий мутагенез, застосування якого дозволяє маркувати симбіотичні гени ризобій, які не мають самостійного фенотипового прояву, відкриваючи тим самим можливість з'ясування окремих ланок механізму формування симбіотичних взаємовідносин між бобовими рослинами і ризобіями [4, 7, 11].

Важливою перевагою цього методу є набуття мутантами маркеру стійкості до антибіотиків, завдяки чому з'являється можливість ідентифікувати мутантні штами ризобій у корневих бульбочках бобових і в ґрунті, слідкувати за їхньою поведінкою після передпосівної інокуляції у різних ґрунтах і за неоднакових екологічних умов, з'ясувати їхню здатність приживатися в ризофері рослин, бути конкурентоспроможними не лише стосовно бактерій інших штамів свого виду, але і до інших ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі й патогенів.

Метою роботи було отримати мутанти повільнорослих бульбочкових бактерій сої зі зміненими симбіотичними властивостями та відібрати кращі з них за конкурентоздатністю, азотфіксувальною активністю і ефективністю симбіозу з рослиною-хазяїном. Впровадження відібраних штамів у рослинництво сприятиме інтенсифікації залучення азоту повітря до біологічного циклу і отриманню високоякісної, екологічно чистої продукції бобових культур.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були 16 штамів *Bradyrhizobium japonicum* (634б, 614а, 631, 622, 646, 606, 603, 102с, W12, К, 71т, 10к, В1, 69г, G80, М8) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів ІФРГ НАН України. Для проведення транспозонового мутагенезу цих штамів використано штам-донор *Escherichia coli* S17-1, який містив плазмиду рSUP2021::Tn5 із маркером стійкості до канаміцину [12]. Рослиною-хазяїном у роботі слугувала соя сорту Мар'яна, рекомендована для вирощування у зонах Лісостепу і Полісся України.

Транспозоновий мутагенез штамів *B. japonicum* проводили за методикою Новикової зі співавт. [5], пристосувавши її для мутування повільнорослих ризобій із використанням плазмиди рSUP2021::Tn5.

Наявність транспозона Tn5 у мутантах ризобій визначали за методикою Гюльхабера зі співавт. [8], а кількісний і якісний

склад білків – за допомогою градієнтного електрофорезу в поліакриламідному гелі [10].

Азотфіксувальну активність визначали ацетиленовим методом [9].

Усі результати обраховували статистично за загальноприйнятою методикою [2].

Результати та їх обговорення. У процесі перевірки 16-ти штамів *B. japonicum* виявилося, що лише три з них, а саме 646, 614а і 71т, чутливі до 50-70 мкг/мл канаміцину (Km) і стійкі до 500-1000 мкг/мл стрептоміцину (Str). Отже, їх можна використовувати як реципієнти плазміди pSUP2021 при проведенні транспозонового мутагенезу (табл. 1).

При кон'югації ризобій з *E. coli* S17-1, що несе плазмиду із вбудованим у неї транспозоном Tn5, частота утворення канаміцинрезистентних мутантів була найвищою у штаму 646 і становила 10^{-6} . Після проведення транспозонового мутагенезу цього штаму нами було отримано понад 1500 Tn5-мутантів.

Штами 614а і 71т за ознаками стійкості до антибіотиків виявилися також придатними для проведення транспозонового мутагенезу, але частота транспозиції у них була нижчою і становила 10^{-7} та 10^{-8} . Деякі інші штами, наприклад, 622, 606, К, В-1, також можуть бути потенційними реципієнтами даної плазміди після їх адаптації до 1000 мкг/мл Str. Таким чином, їх також можна використовувати для проведення транспозонового мутагенезу.

Таблиця 1. Ріст штамів *Bradyrhizobium japonicum* на середовищах із різною концентрацією антибіотиків

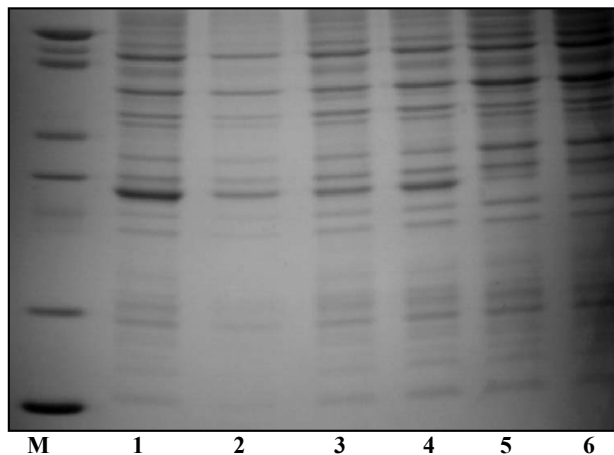
Концентрація антибіотиків, мкг/мл	Штам <i>B. japonicum</i>		
	646	614а	71т
Без антибіотиків (контроль)	++++	++++	++++
Канаміцин, 50	–	+	+
Стрептоміцин, 500	++++	++++	++++
Стрептоміцин, 1000	+++	+++	++++
Частота транспозиції	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

Примітка: ріст ризобій: «++++» – на рівні контролю, «+++» – дещо слабший, «+» – ледь помітний, «–» – відсутній.

Первинний скринінг одержаних мутантів за набутою ознакою стійкості до Km здійснювали за їх здатністю рости на

манітно-дріжджовому агаризованому середовищі з 200 мкг/мл Km. Наявність у них транспозона Tn5 перевіряли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Виявилося, що відібрані нами для аналізу мутанти і, зокрема, мутант 21-2, містив у своєму складі означений транспозон.

Крім того, необхідно було з'ясувати, чи існує відмінність у кількісному і якісному складі білків штамів ризобій і транспозонових мутантів і визначити білки, характерні для активних мутантів. Однак, незважаючи на різні симбіотичні характеристики досліджуваних ризобій, суттєвих відмінностей у їхньому білковому складі не виявлено (рис. 1). Це здається логічним, адже симбіотичні властивості ризобій проявляються лише за умов симбіозу з бобовими рослинами. Проте, на основі отриманих результатів не можна однозначно констатувати відсутність таких білків. Подальші дослідження з використанням більш широкого спектру Tn-5 мутантів зі зміненими симбіотичними характеристиками дозволять ідентифікувати протеїни, задіяні в процесах фіксації молекулярного азоту.



М – білкові маркери; 1– *Bradyrhizobium japonicum* 646; Tn5-мутанти: 2 – 35-2; 3 – 9-1; 4 – 21-2; 5 – 113; 6 – 118-8

Рис. 1. Білковий склад *Bradyrhizobium japonicum* 646 та його Tn5-мутантів:

Наступним етапом досліджень був скринінг отриманих транспозонових мутантів ризобій сої за ознаками “азотфіксація”, “вірулентність” і “ефективність симбіозу”. Спочатку ці мутанти

відбирали за вказаними ознаками в умовах мікровегетаційних експериментів. Показано, що більшість із них не відрізнялися за симбіотичними характеристиками від вихідного штаму. Для подальших досліджень ми взяли близько 100 мутантів бульбочкових бактерій сої, аналіз яких продовжили у вегетаційних та польових умовах. Контролем слугували рослини, інокульовані вихідним 646 і виробничим 6346 штамми.

Із контрастних за азотфіксувальною активністю і вірулентністю відібрано сім Tn5-мутантів ризобій сої, а саме мутанти 21-2, 9-1, 17-2, 35-2, 107, 113, 118-8. У вегетаційних умовах вони були використані для створення модельних симбіотичних систем із різним рівнем ефективності. Tn5-мутанти 21-2, 9-1, 17-2 за вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, їх розташуванням на кореневій системі рослини-хазяїна і, що найважливіше, азотфіксувальною активністю у різні фази вегетації перевищували контрольні штами (рис. 2). Проте, виявлено також три культури (107, 113 і 118-8), які характеризувалися високою вірулентністю, але низькою азотфіксувальною активністю.

Таким чином, одержані нами результати свідчать, що у повільнорослих бульбочкових бактерій сої за допомогою вектора pSUP2021::Tn5 можна отримати канаміцинрезистентні мутанти зі зміненими симбіотичними властивостями, а саме, бульбочкоутворенням, азотфіксувальною активністю і ефективністю симбіозу.

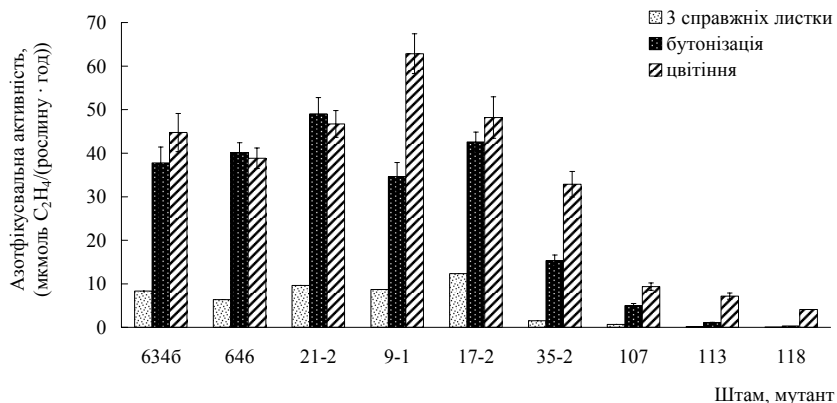


Рис. 2. Динаміка загальної азотфіксувальної активності кореневих бульбочок сої, інокульованої Tn5-мутантами *V. japonicum* 646

Ефективність симбіотичних систем, створених за участю рослин сої і відібраних у вегетаційних дослідах 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 (табл. 2), що інокуляція трьома досліджуваними Tn5-мутантами бульбочкових бактерій сої (21-2, 17-2, 9-1) сприяла достовірному збільшенню маси насіння на 15–23 % у порівнянні з інокуляцією виробничим штамом 6346. Вони виявилися вірулентними та активними мікросимбіонтами рослин сої. Отримані дані свідчать, що за комплексом симбіотичних ознак кращими серед перспективних Tn5-мутантів є 21-2 і 17-2.

Таблиця 2. Урожайність насіння сої, інокульованої Tn5-мутантами *V. jaronicum* (польові дослідження)

Варіанти дослідження	Урожайність, ц/га				± до позитивного контролю (штам 6346)	
	I	II	III	середнє	ц/га	%
Без інокуляції	15,9	17,6	15,8	16,4	– 4,2	– 20,4
Штам						
6346	21,5	22,2	18,2	20,6	–	–
646	20,8	22,7	19,3	20,9	+ 0,3	+ 1,4
Tn5-мутант						
9-1	24,8	26,4	19,8	23,6	+ 3,0	+ 14,7
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 _{0,05}	2,1	2,2	2,0			

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

Отже, у результаті досліджень показано, що транспозоновий мутагенез є ефективним методом одержання нових штамів бульбочкових бактерій. Встановлено, що інокуляція рослин сої активними Tn5-мутантами *V. jaronicum* підвищує ефективність функціонування симбіотичних систем і сприяє збільшенню їх продуктивності.

Після додаткових перевірок конкурентоспроможності і технологічності отримані транспозонові мутанти ризобій можуть бути рекомендовані як біологічна основа бактеріальних добрив для сої.

1. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин /Л.М. Доросинский. – Л.: Наука, 1970. – 191 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
3. Коць С.Я. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов /[С.Я. Коць, С.К. Береговенко, Е.В. Кирichenko, Н.Н. Мельникова]. – К.: Наук. думка, 2007. – 315 с.
4. Курчак О.Н. Плазида pSym 1-32 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, контролирующая азотфиксирующую активность, эффективность симбиоза, конкурентоспособность и кислотоустойчивость /О.Н. Курчак, Н.А. Проворов, Б.В. Симаров //Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1225-1232.
5. Новикова Н.И. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* /Н.И. Новикова, Л.А. Шарыпова, Б.В. Симаров // Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. – 1986. – № 8. – С. 32-36.
6. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий /[Б.В. Симаров, А.А. Аронштам, Н.И. Новикова и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
7. Шарыпова Л.А. Мутагенная активность плазмидных векторов “самоубийц”, содержащих Tn5, у клубеньковых бактерий люцерны /Л.А. Шарыпова, О.П. Онищук, Н.И. Новикова //Генетика. – 1987. – Т. 23, № 12. – С. 2104-2111.
8. Guilhaber M.R. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes /M.R. Guilhaber, L.M. Hoffman, D.A. Mills, B.C. Kirkpatrick //Molec. Plant Microb. Interact. – 2001. – Vol. 14, № 6. – P. 701-706.
9. Hardy R.W.F. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation /R.W.F. Hardy, R.D. Holsten, E.K. Jackson, R.C. Burns //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, N 8. – P. 1187-1207.
10. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 /U.K. Laemmly //Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
11. Pobigaylo N. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti* /N. Pobigaylo, D. Wetter, S. Szymczak et al. //Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4329-4337.
12. Simon R. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria /R. Simon, U. Priefer, A. Puhler //Biotechnol. – 1983. – Vol. 1, № 11. – P. 784-791.

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ TN5-МУТАНТОВ РИЗОБИЙ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ

Коць С.Я., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Дрозденко Г.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

*При помощи штамма *Escherichia coli* S17-1 со встроенной в него плазмидой pSUP2021::Tn5 осуществлен транспозоновый мутагенез штаммов 646, 614a и 71t *Bradyrhizobium japonicum*. Наивысшая частота образования канамицинрезистентных мутантов составляла 10^{-6} (*B. japonicum* 646). Из 1500 полученных мутантов отобраны лучшие по признакам “вирулентность”, “азотфиксирующая активность” и “эффективность симбиоза”. Несмотря на неодинаковые симбиотические характеристики отобранных мутантов, существенных различий в их белковом составе не выявлено. Сделан вывод о возможности получения медленнорастущих ризобий с помощью транспозонового мутагенеза.*

Ключевые слова: транспозоновый мутагенез ризобий, соя, симбиоз, азотфиксация.

PERSPECTIVE USE OF TN5-MUTANTS OF RHIZOBIA IN PREPARATION OF BACTERIAL FERTILIZERS

Kots S.Ya., Malychenko S.M., Mamenko P.M., Drozdenko G.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

*By using strain of *Escherichia coli* with build-in plasmid pSUP2021::Tn5 the transposon mutagenesis of *Bradyrhizobium japonicum* (strains 646, 614a and 71t) was performed. The highest formation frequency of kanamycinresistant mutants was 10^{-6} (*B. japonicum* 646). Among the 1500 mutants obtained, the best were selected by the “virulence”, “nitrogen fixation activity” and “symbiosis efficiency” criteria. In spite of different symbiotic characteristics of the selected Tn-5 mutants no considerable differences in their protein composition were determined. The authors made conclusion on the possibility of use of transposon mutagenesis in order to obtain the new forms of slowgrowing bacteria.*

Key words: transposon mutagenesis of rhizobia, soybean, symbiosis, nitrogen fixation.