

УДК 579.22:575.224.4

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ТА ГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ Tn5–МУТАНТІВ *RHIZOBIUM* *LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE*

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

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

Досліджені генетичні особливості і фізіолого-біохімічні властивості Tn5–мутантів бульбочкових бактерій гороху. Із використанням полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що досліджувані штами дійсно є Tn5–мутантами ризобій гороху, оскільки вони містять фрагмент структурної послідовності гену стійкості до канаміцину транспозона Tn5. Показано, що за фізіолого-біохімічними ознаками Tn5-мутанти бульбочкових бактерій гороху мають як схожі, так і відмінні властивості порівняно до штаму-реципієнту.

Ключові слова: Транспозоновий мутагенез, Tn5–мутанти ризобій гороху, полімеразна ланцюгова реакція.

Вступ. Вивчення мутаційного процесу у бульбочкових бактерій і застосування різних фізичних і хімічних мутагенів дало можливість отримати у ризобій практично всі відомі для мікроорганізмів типи мутантів — морфологічні, ауксотрофні, симбіотичні- і фагостійкі [1]. У багатьох мутантів ризобій змінилась азотфіксувальна активність, ефективність, конкурентоздатність [2]. Одержання різного роду мутантів дозволило встановити роль ряду компонентів бактеріальної клітини у процесі встановлення симбіозу, що дало змогу вивчити механізм експресії симбіотичних генів і створити нові ефективні штами бульбочкових бактерій [3]. Однак застосування мутагенів у роботі з ризобіями втратило актуальність із появою нового генетичного методу — транспозонового мутагенезу. Цей 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, що обумовлюють симбіотичну азотфіксацію, вірулентність бульбочкових бактерій та гени, пов'язані з встановленням симбіотичних відносин ризобій з рослинами [4].

На цей час розроблено кілька експериментальних систем, в яких використовували транспозони Tn5, Tn10, Tn552, але частіше всього використовується транспозон Tn5 [5]. Це 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 найбільш розповсюдженим є *in vivo* підхід із використанням транспозономісних плазмід-самовбивць,

© С.Я. КОЦЬ, Н.М. МАНДРОВСЬКА, О.Д. КРУГОВА, В.М. ЗАЄЦЬ, 2009

які можуть кон'югативно переноситись від спеціальних штамів *E. coli* до широкого кола грам-негативних бактерій [6]. 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. Для модифікованих мікроорганізмів характерні як генетичні, так і фізіолого-біохімічні зміни. Тому для отримання характеристики Tn5-мутантів необхідно паралельно досліджувати ці властивості.

Метою даної роботи стало вивчення генетичних властивостей та фізіолого-біохімічних ознак у отриманих нами Tn5-мутантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. 2636.

Матеріали і методи

Мутанти бульбочкових бактерій гороху були отримані у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України за допомогою транспозонового мутагенезу із використанням вектора pSUP2021:Tn5 [7] і вивчені їх симбіотичні властивості [8].

Для визначення наявності транспозона Tn5 у мутантних ризобій гороху був застосований метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [9].

Бульбочкові бактерії гороху реципієнтного штаму 2636 [10] та одержаних мутантів вирощували на рідкому середовищі № 79 (г/л дист. води; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,1; $CaCO_3$ — сліди, дріжджовий екстракт — 2, казамінові кислоти або лактальбумін — 0,5; маніт — 10; рН середовища — 7,2–7,4, стерилізація при 0,8–1 атм протягом 30 хв).

Через три доби клітини відмивали від полісахаридів та промивали двічі буфером TE (10 mM трис-Cl; рН 8,0; 1 mM EDTA). Для лізису клітин відмитий осад культури суспендували в 0,547 мл буфера TE, додавали 30–50 мкл 10% додецилсульфату та протеїнази К до концентрації 50 мкг/мл і витримували при температурі 37 °С, протягом 60 хв. Для додаткового лізису та подальшої очистки нуклеїнових кислот до лізату додавали 100 мкл 5M NaCl та 80 мкл 10% цетилтриметиламмонійброміду в 0,7M NaCl та інкубували його 15–20 хв при 60 °С. Після цього додавали такий же об'єм розчину хлороформ: ізоаміловий спирт у співвідношенні 24 : 1, суміш перемішували і центрифугували 10 хв при 12000 об/хв на мікроцентрифузі "Eppendorf". Водну фазу з нуклеїновими кислотами відбирали і повторно депротеїнізували таким же об'ємом розчину хлороформ: ізоаміловий спирт 24 : 1 як і раніше. У водній розчин нуклеїнових кислот додавали для гідролізу РНК РНК-азу А до концентрації 50 мкг/мл та інкубували при кімнатній температурі 20–30 хв. ДНК із водної фази осаджували рівним об'ємом 100% ізопропанолу або 2,5 об'ємами 96% етанолу при 12000 об/хв впродовж 10 хв, потім відмивали 70% етанолом і розчиняли в 50 мкл TE.

ПЛР ампліфікацію проводили на ампліфікаторі "Proteus" в об'ємі 30 мкл у суміші реагентів фірми "Ферментас" — 1 x ПЛР буфер, 2mM $MgCl_2$, 0,2mM кожного dNTP. Умови проведення реакції: початкова денатурація — 2 хв при 94 °С, наступні 25 циклів денатурації, гібридизації та синтезу проводили відповідно при 94 °С — 1 хв, при 56 °С — 1 хв та при 72 °С — 1 хв. Останній синтез проводили при 72 °С — 5 хв. На один зразок використовували 50 нг ДНК, 0,25 мікромоль/л кожного прай-

мера та 1U Taq полімерази. Праймери для ПЛР були сконструйовані за допомогою програми "Primer-3" на структурну послідовність гена неоміцинофотрансферази Tn5 довжиною 517 нуклеотидних пар.

Прямий праймер

5'- СТГААТГААСТGCAGGACGAG — 3'

Зворотній праймер

5'- СААТАТСАСGGGTAGCCCAACG — 3'

Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 0,7% агарозному гелі [11, 12].

Фізіолого-біохімічні ознаки транспозонових мутантів і штаму-реципієнта вивчали за методиками [13, 14].

Катаболізм вуглеводів досліджували на поживному середовищі Норіса: (г/л дист.води) — K_2HPO_4 — 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,8, NaCl — 0,2, $FeCl_3$ — 0,1, маніт — 10, дріжджовий екстракт — 1,0, рН 7,2–7,4 з додаванням 0,5–1% певного вуглеводу та індикатора фіолетовий червоний. Пробірки із середовищем інкубували при 27 °С впродовж 48 год. або довше. Зміну кольору середовищ, або утворення газу оцінювали за трибальною системою. Гідроліз полісахаридів, зокрема крохмалю, визначали на картопляному агарі. Для цього, зону росту культур заливали розчином Люголя. Якщо крохмаль гідролізується амілазою утворюються жовті зони, а у разі відсутності ферменту — середовище синіє. Розщеплення білків оцінювали за гідролізом молока із індикатором метиленовим синім, а також за посівом на желатині і бульйоні Хоттінгера. Утворення сірководню визначали з індикаторними папірцями, змоченими у розчині (г/л) оцтовокислого свинцю $Pb(CH_3COOH)$ — 20,0 і карбонату натрію Na_2CO_3 — 1,0. Нітратредукцію визначали на мінеральному середовищі з KNO_3 за допомогою реактива Грісса.

Результати та обговорення

Реципієнтом для одержання мутантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. слугував шт. 2636 [10]. У процесі мутагенезу із використанням штаму *E. coli* S-17, трансформованого плазмідом *rhoS* рSUP2021:Tn5, були отримані канаміциностійкі мутанти бульбочкових бактерій гороху. Як показали наші дослідження, одержані Tn5-мутанти відрізнялись від вихідного штаму за симбіотичними властивостями [8] та конкурентоздатністю [15]. Один із Tn5-мутантів, а саме M_1 , був запатентований як високоактивний штам для одержання бактеріальних добив під горох і депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [7].

Постала необхідність молекулярного аналізу отриманих мутантних ризобій, щоб з'ясувати чи знаходиться транспозон у їхньому геномі. Для аналізу Tn5-мутантів ризобій гороху використали метод полімеразної ланцюгової реакції.

Як маркер відбору транспозантів при транспозоновому мутагенезі бульбочкових бактерій гороху використали ген стійкості до канаміцину. Контролями були взяті штами 2636 та штам *E. coli* S-17, який містив плазмід рSUP2021:Tn5.

Із результатів полімеразної ланцюгової реакції видно (рис.), що досліджуваний контрольний штам-реципієнт *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 2636 не містить у своєму геномі фрагмента ДНК гена стійкості до канаміцину транспозону Tn5. У той час ПЛР аналіз показав наявність даного фрагмента транспозону довжиною 517 нуклеотидних пар у Tn5-мутантів бульбочкових бактерій гороху M_1 і M_2 . Це свідчить про наявність в їх геномі гена

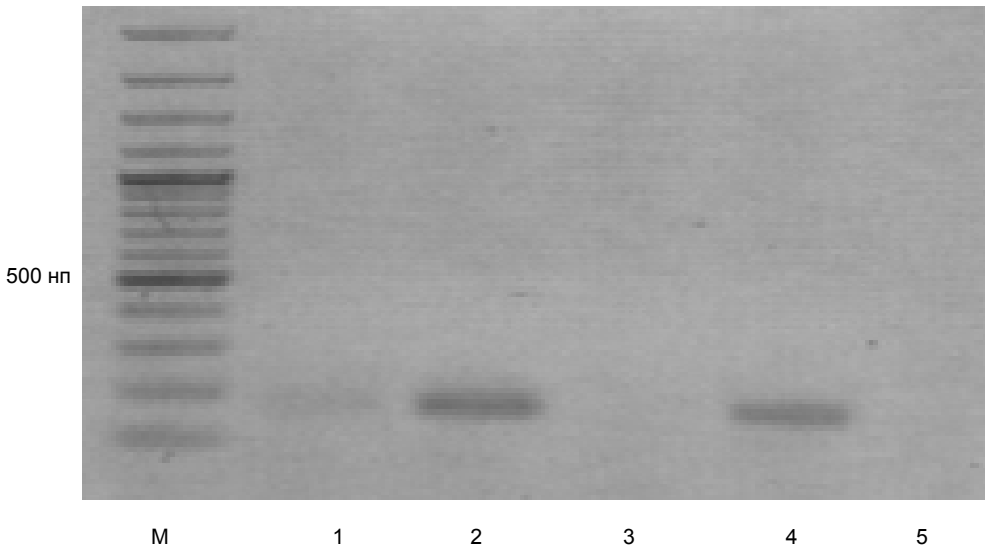


Рисунок. ПЛР-аналіз ДНК мутантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* на наявність в їхньому геномі транспозону Tn5. Ампліфікацію було проведено з праймерами, комплементарними до структурної послідовності гена неоміцинфосфотрансферази транспозону Tn5 довжиною 517 н.п.: М — маркер молекулярної маси ДНК (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, “Fermentas”); 1 — вихідний штам 263б (негативний контроль); 2 — мутант M₁; 3 — мутант M₂; 4 — мутант M₃; 5 — *E. coli* S-17, який містить плазмиду pSUP2021:Tn5 (позитивний контроль)

неоміцинфосфотрансферази, тобто вони є Tn5-мутантами.

У геномі мутанта M₃ не виявлено транспозону Tn5, тому його не можна вважати справжнім транспозоновим мутантом. Причиною відсутності послідовності транспозону Tn5 у геномі M₃ може бути те, що він є або спонтанним мутантом, або з часом втратив транспозон [16].

Таким чином, використаний нами метод ПЛР аналізу геномної ДНК ризобій гороху на наявність послідовності гена неоміцинфосфотрансферази транспозону Tn5 підтвердив, що набута стійкість до антибіотика є результатом інтеграції в їхній геном Tn5.

Поряд із встановленням генетичних змін у Tn5-мутантів ризобій гороху необхідно було дослідити їхні основні

фізіолого-біохімічні ознаки порівняно із штамом-реципієнтом, що важливо для їх подальшого вивчення і використання. Нами було встановлено, що досліджені мутанти як і вихідний штам були грам-негативні, рухливі, клітини мали паличковидну форму, добре росли на поживному середовищі Мазе і середовищі № 79.

Бульбочкові бактерії засвоюють широкий спектр вуглеводів, використовуючи їх як джерело енергії для синтезу різних метаболітів [14]. Так, гексози у клітинах ризобій катаболізуються до пірувата в основному шляхом Ентнера-Дудорова, але у деяких штамів виявлені ферменти шляху Ембдена-Мейергофа-Парнаса. У швидкорослих ризобій присутні ферменти пентозо-

Таблиця 1. Катаболізм вуглеводів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* шт. 2636 та його Tn5-мутантами

Вуглевод	Штам		
	2636	M ₁	M ₂
Моносахариди			
Арабіноза	+++	+++	+++
Глюкоза	+++	+++	+++
Ксилоза	++	++	+++
Рамноза	+++	+++	+++
Сорбоза	++	—	—
Дисахариди			
Лактоза	+++	+++	+++
Мальтоза	+++	+++	+++
Сахароза	+++	+++	+++
Трисахарид			
Рафіноза	++	++	++
Сахароспирти і полісахариди			
Маніт	+++	+++	+++
Сорбіт	+++	—	—
Інозитол	++	—	—
Декстрин	++	—	—
Крохмаль	++	—	—

Примітки: +++ — нормальний ріст; ++ — слабкіший ріст; — відсутність росту.

фосфатного шляху: глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази, 6-фосфоглюконат-дегідрогенази [17]. Засвоєння пентоз, зокрема арабінози, швидкорослими бульбочковими бактеріями здійснюється завдяки утворенню 1 β-кетоглютаратсимальдегіду і кетоглютарату [17, 19].

Досліджувані мутантні штами, як видно з даних табл. 1, активно катаболізують моносахариди — арабінозу, глюкозу, але на відміну від вихідного штаму не засвоюють сорбозу. Завдяки наявності у них індуцибельної інвертази, спроможні катаболізувати дисахариди — лактозу, мальтозу, сахарозу. Вони добре засвоюють трисахарид рафінозу, а також сахароспирти — маніт і сорбіт, але на відміну від вихід-

ного штаму не катаболізують інозитол, декстрин і полісахарид — крохмаль.

Метаболізм азоту у швидкорослих ризобій пов'язаний із здатністю бактерій під дією ферментів нітратредуктази та уреази використовувати як джерело азоту солі амонію, нітрати, сечовину. Джерелом азоту для ризобій можуть бути деякі амінокислоти, зокрема, глутамат, а також аргінін, гістидин, пролін, які утворюються у процесі дезамінування [14]. Як показали результати досліджень Tn5-мутанти, як і вихідний штам здатні до нітратредукції. Почервоніння середовища із реактивом Грісса, що спостерігається у вихідного штаму, так і Tn5-мутантів, вказує на появу нітриту, який утворився в результаті відновлення нітрату (табл.2).

Таблиця 2. Фізіолого-біохімічні властивості Tn5-мутантів бульбочкових бактерій гороху

Варіант	Розщеплення білків				Колір середовища	Редукція нітратів	
	ріст на бульйоні	желатина	виділення H ₂ S	пептонізація молока		ріст	колір середовища
2636	—	—	—	++	Слабо блакитний	+++	рожевий
M ₁	—	—	—	+++	Прозорий	+++	рожевий
M ₂	—	—	—	+++	Прозорий	+++	рожевий

Примітки: +++ — нормальний ріст; ++ — слабкіший ріст; — відсутність росту.

Для дослідження здатності транспозонів мутантів бульбочкових бактерій гороху розщеплювати білки використали різні середовища: знежирене молоко з індикатором метиленовим синім, бульйон Хоттінгера, желатину, індикаторні папірці на наявність сірководню. Із результатів, наведених у табл. 2, видно, що вихідний штам 2636 слабо пептонізує молоко, а мутанти M₁ і M₂, отримані на його основі, активно проводять цю реакцію — молоко з індикатором після гідролізу (пептонізації) ставало прозорим за рахунок розщеплення казеїну до розчинних амінокислот та пептидних фрагментів. Мутанти, як і вихідний штам, не ростуть на бульйоні Хоттінгера, не виділяють сірководню, не розріджують желатину.

Таким чином, як видно із наведених даних, Tn5-мутанти ризобій гороху за фізіолого-біохімічними ознаками мають як спільні, так і відмінні властивості у порівнянні з штамом-реципієнтом.

Висновки

Вивчені генетичні та фізіолого-біохімічні ознаки (катаболізм вуглеводів, нітратредукція, стійкість до антибіотиків, ПЛР аналіз) у отриманих нами Tn5-мутантів бульбочкових бактерій гороху у порівнянні зі штамом-реципієнтом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 2636.

За результатами полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що досліджувані мутанти M₁ і M₂ є дійсно Tn5-мутантами ризобій гороху, тому що вони містять фрагмент структурної послідовності гена стійкості до канаміцину транспозону Tn5.

Показано, що за фізіолого-біохімічними ознаками Tn5-мутанти ризобій гороху мають як спільні, так і відмінні властивості із вихідним штамом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 2636.

Перелік літератури

1. *Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции* / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. — СПб.: Наука, 1998. — 193с.
2. *Проворов Н.А., Симаров Б.В., Федоров С.Н.* Симбиотические свойства разных типов мутантов клубеньковых бактерий // Изв. АН СССР. — 1985. — № 6. — С. 870–884.
3. *Генетические основы селекции клубеньковых бактерий* / Под ред. Б.В. Симарова. — Л.: Агропромиздат, 1990. — 192 с.
4. *Проворов Н.А., Симаров Б.В.* Направления конструирования штаммов клубеньковых бактерий с повышенной симбиотической эффективностью // Молекулярные механизмы генетических процессов. — М. — 1991. — С. 190–194.

5. *Reznikoff W.S.* The Tn5 transposon // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1993. — Vol. 47. — P. 945–963.
6. *Simon By.R., O'Connell M., Labes M., Pыhler A.* Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobium* and other gram-negative bacteria // *Methods in Enzymology.* — 1986. — Vol. 118. — P. 645–659.
7. Патент № 81577 України МПК СО5F 11/08 С12R 1/41. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* М₁ для одержання бактеріального добрива під горох // Коць С.Я., Мандровська Н.М., Кругова О.Д. — Опубл. 10.01.2008. Бюл № 1.
8. Мандровська Н.М., Кругова О.Д., Коць С.Я. Ефективність симбіозу рослин гороху із транспозантами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 2636 // *Вісник ХНАУ.* — 2007. — випуск 8 (10) — С. 65–79.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. — Москва: Мир, 1984. — С. 182–194.
10. Патент № 21012 А Україна, МКИ6 СОБФ 11/08 С12R 1:4. Штам бактерій *Rhizobium leguminosarum* для одержання бактеріального добрива під горох // Ю.П. Старченков, Н.М. Мандровська, М.М. Нічик, О.Д. Кругова та ін. — Опубл. 27.02.98, Бюл. № 1.
11. *Reznikoff W.S.* Transposon Tn5 // *Annu. Rev. Genet.* — 2008. — Vol. 42. — P. 151–158.
12. *Chachaty E., Saulnier P.* Isolation chromosomal DNA from bacteria // *In the Nucleic Acid Protocols Handbook* (Edited by R.Rapley). — Humana Press Inc., Totowa NJ, 2000. — P. 29–32.
13. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований. — М.: Высшая школа, 1972. — 480 с.
14. *Готшлак Г.* Метаболизм бактерий. — М.: Би, 1982. — 310 с.
15. *Кругова О.Д., Мандровська Н.М.* Нодуляційна конкурентна здатність Tn5-мутантів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* // Сільськогосподарська мікробіологія; міжвідомчий тематичний науковий збірник. — 2007. — випуск 6. — С. 18–28.
16. *Maloy R.* Use of antibiotic-resistant transposons for mutagenesis // *Methods in Enzymology.* — 2007. — Vol. 421. — P. 11–17.
17. *Martinez-Drets E., Arias A.* Enzymatic basic for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow growing groups // *J. Bacteriol.* — 1972. — Vol. 105, N 1. — P.467–469.
18. *De Vries A., Van brussel L.* Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum* // *J. Bacteriol.* — 1982. — Vol. 149, N 1. — P.872–876.
19. *Duncan M., Fraenkec D.* Ketoglutaratedehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti* // *J. Bacteriol.* — 1979. — Vol. 37, N 1. — P.415–419.

Представлено М.В. Кучуком
Надійшла 25.02.2009

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ Tn5-
МУТАНТОВ RHIZOBIUM
LEGUMINOSARUM BV. VICEAE

С.Я. Коць, Н.М. Мандровская,
Е.Д. Кругова, В.Н. Заец

Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Украина, 03022, Киев,
ул. Васильковская, 31/17
e-mail: azot@ifrg.kiev.ua

Исследованы генетические особенности и физиолого-биохимические свойства Tn5-мутантов клубеньковых бактерий гороха. С использованием полимеразной цепной реакции установлено, что исследуемые штаммы действительно относятся к Tn5-мутантам ризобий гороха, поскольку они содержат фрагмент структурной последовательности гена устойчивости к канамицину транспозанта Tn5. Показано, что по физиолого-биохимическим свойствам Tn5-мутанты клубеньковых бактерий горо-

ха имеют как общие, так и отличительные признаки в сравнении со штаммом-реципиентом.

Ключевые слова: *транспозоновый мутагенез, Tn5-мутанты ризобий гороха, полимеразная цепная реакция.*

THE PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL
AND GENETICAL CHARACTERISTICS
OF TN5-MUTANTS OF *RHIZOBIUM*
LEGUMINOSARUM BV. *VICEAE*

*S. Ya. Kots, N. M. Mandrovska,
O. D. Krugova, V. M. Zaets*

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

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska St., 31/17
e-mail: azot@ifrg.kiev.ua

The genetical and physiological and biochemical properties of pea nodule bacteria were studied. Using of polymerase chain reaction it was established that studied strain were actually Tn5-mutants of pea rhizobia, since they contained part of structure sequence of Tn5 kanamicin resistance gene. It was shown that Tn5-mutants of pea nodule bacteria had as the same as distinctive signs by physiological and biochemical properties in comparison with strain-recipient.

Key words: *transposon mutogenesis, Tn5-mutants of pea rhizobie, polymerase chain reaction.*