

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ҐЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ЄРКО Володимир Миколайович

УЧАСТЬ ЛОКУСУ БІОСИНТЕЗУ ЛЕЙЦИНУ
RHIZOVIUM MELILOTI
В РОЗВИТКУ АЗОТФІКСУЮЧОГО
СИМБІОЗУ З ЛЮЦЕРНОЮ
(*Medicago sativa* L.)

03.00.15 — генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук



Київ — 1994

975
Дисертація є рукопис

Робота виконана у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики Національної академії наук України м. Київ

Наукові керівники:

доктор біологічних наук

Старченков Юхим Полікарпович

кандидат біологічних наук

Аронштам Олександр Аркадійович

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,

член-кореспондент Національної академії

наук України, професор

Мацелях Богдан Павлович

кандидат біологічних наук

Козировська Наталія Олексіївна

Провідна установа:

Київський державний університет ім. Т. Г. Шевченка.

Захист дисертації відбудеться «26» травня 1994 р.
о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.57.01
по захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук
при Інституті фізіології рослин і генетики АН України за адресою:
252022, Київ 22, вул. Васильківська, 31/17.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики АН України.

Автореферат розісланий «19» квітня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Труханов В. А.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00802232 (H)

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Проблема біологічної фіксації молекулярного азоту є однією із найбільш складних фундаментальних проблем біології і надзвичайно актуальною для сільськогосподарської біології, тому що вона напряму пов'язана з врожайністю важливих кормових культур – бобових рослин. Безперечно, що майбутні перспективи на покращення азотної економіки вищих рослин шляхом генетичних маніпуляцій з азотфіксуючими мікроорганізмами залежать від наших фундаментальних знань генетики і молекулярної біології цього складного процесу. Значний резерв для підвищення ефективності симбіозу між мікроорганізмами і вищими рослинами полягає в направленому конструюванні штамів мікроорганізмів, які безпосередньо забезпечують своїх рослин-господарів фіксованим із повітря азотом. Проте, покращення симбіотичних властивостей цих мікроорганізмів неможливе без ретельного генетичного аналізу всіх факторів, які забезпечують такий складний молекулярний процес як симбіотична азотфіксація. Симбіоз між *Rhizobium meliloti* і *Medicago sativa* L. може виступати як широко вивчений приклад комплексної взаємодії між рослиною і бактеріями.

Одержання у ризобій ауксотрофних мутантів дало початок вивченню взаємозв'язку між їх первинним метаболізмом і симбіотичними властивостями і виявило, що деякі ферменти, які приймають участь у метаболізмі амінокислот конче необхідні для нормального протікання процесу азотфіксації або формування симбіозу. Зокрема, вивчення ауксотрофних по лейцину мутантів *Rhizobium meliloti* показало, що вони формують на люцерні білі, нездатні до азотфіксації бульбочки, що говорить про можливу участь ферментів біосинтезу лейцину в утворенні ефективного симбіозу (Truchet, 1980). Крім того, метаболізм лейцину тісно пов'язаний із метаболізмом глутамату, важливість якого для симбіозу безперечно доведена (Евстигнеєва, 1988). Але на відміну від цієї амінокислоти, про роль лейцину у симбіозі і досі нічого невідомо. В зв'язку із вищесказаним зрозуміла необхідність вивчення ролі лейцину і ферментів його метаболізму у формуванні азотфіксуючого симбіозу *R. meliloti* з люцерною.

МЕТОД даної роботи було: вивчити вплив генів біосинтезу лейцину бульбочкових бактерій (*Rhizobium meliloti*) на формування азотфіксуючого симбіозу з люцерною (*Medicago sativa* L.). В зв'язку з цим, були поставлені такі **ЗАДАЧІ**:

1. Використовуючи метод неспецифічного транспозонового мутагенезу одержати ауксотрофні за лейцином мутанти бульбочкових бактерій люцерни;

2. Використовуючи банк генів *Rhizobium meliloti* клонувати фрагмент геному, що містить ген біосинтезу лейцину, інсерція транспозону в який веде до втрати властивості утворювати азотфіксуючий симбіоз із люцерною;

3. З'ясувати зв'язок між біосинтезом лейцину і симбіотичними властивостями бульбочкових бактерій люцерни.

НАУКОВА НОВИЗНА. Одержано ауксотрофний за лейцином мутант штаму *Rhizobium meliloti* СХМІ, симбіотичні властивості якого відрізняються від описаних в літературі. Проведено клонування, ідентифікацію, реклонування в різні вектори і фізичне картування локусу, який відповідає за біосинтез лейцину, показана його участь в формуванні азотфіксуючого симбіозу з люцерною. Продемонстрована сортова і індивідуальна мінливість рослини-господаря по здатності вступати в симбіоз із використанням в роботі лейциновим мутантом *R. meliloti*. Показано, що ця мінливість не обумовлена трофічними потребами в лейцині у ауксотрофного мутанта. Цей факт, а також результати комплементациї лейцинової ауксотрофності даного мутанта банками генів *R. meliloti* СХМІ і *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 дозволив висунути твердження про функціональну важливість локусу біосинтезу лейцину при створенні азотфіксуючого симбіозу і можливість існування тісно зчепленого з геном біосинтезу лейцину гену, що відповідає за симбіоз.

ТЕОРЕТИЧНЕ І ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ. Показана участь одного із локусів біосинтезу лейцину *R. meliloti* СХМІ у створенні симбіозу з люцерною, мутація в якому приводить до блокування виходу бульбочкових бактерій із інфекційних ниток в клітини кореня рослини. Показана можливість існування тісно зчепленого з лейциновим локусом гена, що відповідає за розвиток симбіозу між ризобіями і люцерною.

Виявлена мінливість рослини-господаря по здатності вступати в симбіоз із ауксотрофним за лейцином мутантом відкриває перспективи для селекції люцерни з підвищеною чутливістю на інокуляцію бульбочковими бактеріями 1, відповідно, більш високим азотфіксуючим потенціалом та врожайністю.

ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ.

1. Мутація в одному з лейцинових локусів *R.mellotti* СХМІ приводить до ауксотрофності за лейцином і блокування розвитку симбіозу між бульбочковими бактеріями і рослинами люцерни (*Medicago sativa* L.) за рахунок гібелі бактерій в інфекційній нитці. При цьому додавання екзогенного лейцину у поживне середовище не приводить до відновлення симбіозу.

2. Існує велика індивідуальна мінливість люцерни в межах сортів за здатність утворювати бульбочки при інокуляції мутантом Т46, що свідчить про неоднорідність сортів по бульбочкоутворенню при інокуляції ауксотрофом із мутацією в локусі біосинтезу лейцину.

3. Меродиплоїдія і поліплоїдія по лейциновому локусу у штамі *R.mellotti* СХМІ не приводить до змін в розвитку симбіозу, азотфіксуючої активності і ефективності штаму.

4. Лейциновий локус бульбочкових бактерій люцерни функціонально важливий для формування симбіозу між *Rhizobium mellotti* і *Medicago sativa* і може утримувати регуляторний ген, що відповідає за продукцію "молекулярних сигналів", які індукують утворення бульбочок у рослині.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались на I-ому Міжнародному конгресі "Симбіоз" (Єрусалим, 1991), 6-ому Всесоюзному Біохімічному з'їзді (Санкт-Петербург, 1992), 8-ому з'їзді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993).

ПУБЛІКАЦІЇ. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті.

СТРУКТУРА І ОБ'ЄМ ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація викладена на 127 сторінках машинописного тексту і в своєму складі має 8 таблиць і 13 малюнків. Бібліографія включає 145 джерел. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, методів дослідження, експериментальних результатів і їх обговорення, заключення, висновків, доповнення і списку літератури.

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

ШТАМИ БАКТЕРІЙ І ПЛАЗМІДИ. В роботі були використані: штами бульбочкових бактерій люцерни *Rhizobium meliloti* із колекції лабораторії генетики і селекції мікроорганізмів Всеросійського науково-дослідного Інституту сільськогосподарської мікробіології (м. Санкт-Петербург); штами кишкової палички *Escherichia coli* HB101 (hsdS, hsdM, pro, leu, thi, gal, lacY (Маниатис, Фрич, 1984), S17-1 (F⁻, λ⁻, recA, hsdR⁻, несе модифіковану плазмиду RP4, без маркерів Ap^r, To^r, Km^r (Simon, Priefer, 1983); плазмиди pRK2013 (Nm^r, ColE1 реплікон, що утримує tra-гени плазмиди pRK2) (Figuera, Helinski, 1979), pSUP202 (Ap^r, To^r, Cm^r, mob-сайт RP4) (Simon, O'Connell, 1986), pSUP104 (pACYC184::mob, nio, oriV, rep із RSP1010, To^r, Cm^r) (Priefer, Simon, 1985), pSUP2021 (Ap^r, Cm^r, pBR325::mob, Tn5) (Simon, Priefer, 1983); банки генів *Rhizobium meliloti* CXMI і *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VF39, побудовані на основі космід pLAPR5 і pLAPR1, відповідно (Умаров, Івашина, 1992).

ГЕНЕТИЧНІ І БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ. Tn5 мутагенез і аналіз мутантів. Введення транспозону в штам CXMI *Rhizobium meliloti* було проведено при скрещуванні із штамом *Escherichia coli* S17-1, що утримував плазмиду pSUP2021, за допомогою процедури описаної в літературі (Simon, O'Connell, 1986). Стійкі до неоміцину транскон'юганти перевірялись на здатність рости на мінімальному середовищі. Ідентифікацій ауксотрофів проводили, використовуючи суміші різних амінокислот, азотистих основ і вітамінів (Davis, 1980).

Аналіз плазмідного складу методом "лізису в гелі" проводили на основі електрофорезу за Екхардтом (Eckhardt, 1978).

Для виділення плазмід із штамів *E. coli* і *R. meliloti* застосовували метод Бірнбойма і Долі (Birnboim, 1979).

Препаративне виділення плазмід. Препаративне виділення плазмід для реклонування leu фрагменту із pLAPR5::leu в pSUP202 і реклонування leu фрагменту із pSUP202::leu в pSUP104 проводили із штамів *E. coli* за допомогою метода Бірнбойма і Долі (Birnboim, Doly, 1979) з подальшою очисткою центрифугуванням в двохступене-

вому градієнті CsCl (Маниатис, Фрич, 1984).

Виділення тотальної ДНК *Rhizobium meliloti* проводили у відповідності з методикою (Маниатис, 1984).

Рестрикційний аналіз і лігування. Використовували ендонуклеази рестрикції EcoRI, HindIII і XhoI, а також ДНК-лігазу фагу T4 ("НПО Фермент", м.Вільнюс). Буфери для рестрикції готували строго по інструкції заводу-виробника. Рестрикцію проводили при 37°C, лігування - при 12°C.

Приготування компетентних клітин *E.coli* проводили з використанням CaCl₂, трансформацію проводили у відповідності з методикою (Маниатис, Фрич, 1984).

Кон'югація між штамми *R.meliloti* і *E.coli* проводили у співвідношенні 5:1 клітин, відповідно (Simon, 1986).

Комплементация ауксотрофності мутанту T46 банками генів. Для комплементации лейцинової ауксотрофності мутанту *R.meliloti* T46 були використані банки генів *R.meliloti* CXMI і *R.leguminosarum* bv. *utaseae* VF39. Штами *E.coli* HB101, що мали в своєму складі косміди pLAFR5 і pLAFR1 з фрагментами ДНК геному бульбочкових бактерій люцерни і бульбочкових бактерій вики, відповідно, а також плазмиду pRK2013 вирощували ніч на рідкому середовищі LB з відповідним антибіотиком при 200 об./хв. Штам *R.meliloti* T46 вирощували на рідкому середовищі ДТМ з добавкою Nm (100 мг/л) добу при 200 об./хв. Для скрещування брали 20 мкл суспензії клітин *E.coli* HB101 з відповідним банком генів, 20 мкл - *E.coli* HB101 (pRK2013) і 100 мкл *R.meliloti* T46 з однаковою оптичною щільністю, перемішували їх, концентрували центрифугуванням в 20 мкл стерильної води і кон'югаційну суміш наносили на чашку Петрі з твердим середовищем LB. Скрещування проводили ніч. Готували відповідні розведення кон'югаційної суміші і висівали їх на мінімальне середовище, доповнене 500 мг/л Str. Клони, які виростили на цьому середовищі, пересівали на повні і мінімальні середовища з Tc (20 мг/л) і з Nm (200 мг/л).

Блот-гібридизация ДНК. Блот гібридизация проводилась на основі широко відомої методики (Маниатис, Фрич, 1984) з додаванням в гібридизаційний буфер формаміду. В реакції нік-трансляції використовували мічені [³²P] дезоксинуклеотиди (ІЯФ АН Узбекистану)

Реклонування leu фрагменту ДНК *R. mellotti* СХМІ. Реклонування EcoRI leu фрагменту ДНК із рекомбінантною космідою pLAFR5::leu в плазміді pSUP202 1 із pSUP202::leu в pSUP104 проводили за допомогою рестрикції EcoRI ендонуклеазов плазмідних ДНК pLAFR5::leu 1 pSUP202::leu, розділення їх EcoRI фрагментів електрофорезом в 0,7% агарозному гелі 1 подальшим переносом leu фрагменту на DEAE-бумагу. ДНК з DEAE-бумаги змивали розчином 1 М NaCl в ТЕ буфері, проінкубувавши її при 60°C 1 год. з подальшим осадженням ДНК двома об'ємами спирту, розчиненням її в H₂O 1 лігуванням з відповідною, лінеарізованою по EcoRI сайту плазмідом.

ВИВЧЕННЯ СИМБІОТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ. Оцінку симбіотичних властивостей штамів проводили в умовах мікровегетативних 1 вегетативних дослідів.

Мікровегетативні досліді. Насіння люцерни *Medicago sativa* L. стерилізували концентрованою сірчаню кислотю 2 хв., промивали стерильною дистильованою водою 1 пророщували добу в чашках Петрі на вологій фільтрувальній бумазі. В скляні пробірки (20x160 мм) із стерильним вермікулітом (15 см³) 1 середовищем Красильникова-Кореніко (Федоров, 1951) висаджували по одному проростку. Через три доби проводили інокуляцію, використовуючи 1 мл добової культури бульбочкових бактерій необхідного титру в розчині мікроелементів (Федоров, 1951). Рослини вирощували при 16-годинному фотоперіоді 1 додатковому освітленні 40 000 лк в теплиці 35 днів. Для оцінки азотфіксуючої активності використовували метод ацетиленової редукції (Hardy, Holsten, 1968). Для цього пробірки з рослинами закривали герметично ковпачками 1 вводили в них по 6 см³ ацетилену (10% від об'єму пробірки). Через 24 години проводили відбір проб із кожної пробірки 1 аналізували ацетиленредукцію на газовому хроматографі "Цвет-106". Ефективність симбіозу оцінювали по сухій масі паростків рослин.

Вегетативні досліді. Для вирощування люцерни в вегетативних дослідях використовували посудини Вагнера на 8 кг ґрунту (опідзолений чорнозем, перемішаний з піском у співвідношенні 3:1, вологемність 31%) у який додавали поживний розчин Пряншішківа (Гродзинский, 1964) з 0,1 норми азоту 1 мікроелементи (Федоров, 1951). Сухе насіння люцерни висаджували в посудини Вагнера по 50

насінин/сосуд. На фазі розвитку 2-3 листки проростки проривали залишаючи по 10 рослин/сосуд. Повторне проривання проводили на фазі 5-6 листків, залишаючи по 6 рослин/сосуд. Для визначення ацетиленредукції корені рослин відмивали від ґрунту, відділяли від рослин і по два кореня помішали в герметичні сосуди на 50 мл, з яких шприцем відбирали по 5 мл повітря і накачували по 5 мл ацетилену. Редукцію ацетилену визначали через годину інкубації при 28°C на газовому хроматографі "Chrom 504". Ефективність симбіозу оцінювали по накопиченню сухої надземної маси рослин/сосуд і по індивідуальній сухій масі паростків рослин.

ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІЙ ІЗ БУЛЬБОЧОК. Бульбочки відділяли від коренів, стерилізували в 96% етанолі 1 хв. і промивали стерильною водою. Кожну бульбочку гомогенізували за допомогою скляної палички в 20 мкл стерильної води в пробірках "епендорф". Розведення одержаної суспензії висівали на повне і селективні середовища.

УЛЬТРАСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ БУЛЬБОЧОК. Бульбочки відділяли від 35-добових рослин люцерни і фіксували 2,5% глутаровому альдегіді на каодилатному буфері (O, I M, рН 7,4) і дофіксували розчином OsO_4 (1%) на такому ж буфері і водним розчином галлової кислоти (1%). Збезводнені в етанолі зростаючої концентрації і ацетоні бульбочки помішали в суміш араалдітів з подальшою полімеризацією. Зрізи, одержані на ультратомі "Reichert - Young", забарвлювали ураніацетатом і цитратом свинцю і вивчали в електронному мікроскопі Н-300 (Hitachi) при прискорюючій напрузі 70 кВ.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.

ОДЕРЖАННЯ АУКСОТРОФНОГО ЗА ЛЕЦИНОМ МУТАНТУ *R. meliloti*.

В результаті неспецифічного транспозонового мутагенезу штаму *R. meliloti* СХМІ одержано 3000 транспозантів, серед яких відібрано 9 ауксотрофів. Серед них, в результаті стерильного мікро-вегетатійного дослідження, були виявлені 3 Pix^- мутанти. Рослини, інкульовані цими мутантами, проявляли характерні ознаки азотно-го голодування і мали масу в 2-3 рази меншу у порівнянні з вихідним штамом СХМІ (Табл. I). Визначення ростових потреб ауксотрофних мутантів показало, що нездатність до росту на міні-

мальному середовищі мутанта *R. mellott* T46 пов'язана з блоком в синтезі амінокислоти — лейцину. Цей мутант виявився дуже стабільним і практично не ревертував до прототрофності навіть при висіві на чашку 10^9 клітин. Він формував на рослинах дрібні, білі, нездатні до азотфіксації бульбочки, з яких, при висіванні вмісту бульбочок, не виділялись бульбочкові бактерії.

ВЗАЄМОДІЯ МУТАНТУ *R. mellott* T46 З РІЗНИМИ СОРТАМИ ЛЮЦЕРНИ.

Мінливість рослини-господаря може впливати на прояв симбіотичних властивостей ризобій, у яких виникли мутації в генах, що контролюють синтез деяких метаболітів і відповідають за нормальний розвиток симбіозу. В зв'язку з цим було проведено оцінку сортової специфічності рослини-господаря на здатність вступати у симбіоз з ауксотрофом *R. mellott* T46. Для цього провели скринінг 4-х сортів люцерни (Зайкевича, Вахшська-233, Вега і Марусинська-425; в 40-кратній повторності) в умовах стерильного мікровегетативного досліду в пробірках. Результати цієї оцінки приведені в табл.2, із якої видно, що при високому титрі мутантних клітин в інкулюмі (10^7 клітин/рослину) від 10 до 30% рослин виявились зовсім позбавленими бульбочок. Крім цього, було виявлено по одній рослині сортів Зайкевича і Вега, які мали червоні крупні бульбочки, позбавлені, однак, азотфіксуючої активності, із яких виділялись тільки ауксотрофні по лейцину клітини. При використанні для інкуляції суспензії мутанту T46 з низьким титром (10^5 клітин/рослину) більшість рослин сортів Зайкевича, Вега, Марусинська-425 (біля 70%) не мали бульбочок, тоді як для сорту Вахшська-233 таких рослин було відмічено 34,2%. Суттєво, що вихідний штам СХМІ формував нормальні азотфіксуючі бульбочки при титрі бактерій в інкулюмі 10^3 клітин на рослину. Тобто, здатність до утворення бульбочок у мутанта зни-

Табл.І. Маса сухих паростків люцерни с.Зайкевича інкульованих вихідним штамом *R. mellott* СХМІ та його Fix⁻ транспозантами.

мутант	маса рослини, мг	НСР ₀₅
СХМІ	24,2	
T46	9,4	7,1
T68	11,7	
T70	11,3	

Табл.2. Здатність лейцинового ауксотрофу T46 *R.mellott* утворювати бульбочки на люцерні різних сортів.

Сорт	Титр бактерій на одну рослину	Число перевіре- нних рослин	КІЛЬКІСТЬ РОСЛИН, %			2*Sp
			без бульбо- чок	з бульбочками		
				білими	червоними	
Зайкевича	10 ⁷	40	22,5	75,0	2,5	5,1
	10 ⁵	14	64,3	35,7	0	25,6
Вахтська- 233	10 ⁷	41	31,7	68,3	0	14,5
	10 ⁵	21	34,2	65,8	0	20,7
Вега	10 ⁷	61	9,8	88,5	1,7	2,9
	10 ⁵	19	68,4	31,6	0	21,3
Марусин- ська-425	10 ⁷	40	20,0	80,0	0	12,6
	10 ⁵	26	73,1	26,9	0	17,3

2*Sp - довірчий інтервал долі для 95% рівня вірогідності

жена у порівнянні із штамом СХМ1 за рахунок якоїсь специфічної участі лейцину в цьому процесі, або за рахунок того, що бактерії з низьким титром виживають гірше ніж з високим.

Одержані дані показують, що на фоні фактичної відсутності помітних міжсорткових відмін має місце велика внутрішньосортова, індивідуальна мінливість рослин люцерни на інокуляцію лейциновим ауксотрофом. Можливо, неоднорідність сортів по даній ознаці може бути використана в селекції сортів люцерни.

Додавання лейцину (0,02 - 0,06 мМ кінцева концентрація) безпосередньо до середовища росту рослин, інокульованих мутантом T46 в мікровегетатційному досліді, не впливало на формування симбіозу - рослини люцерни або не мали бульбочок, або розвиток бульбочок був заблокований на досить ранніх стадіях. Ці дані відрізняються від результатів одержаних групов французьких дос-

лідників (Truchet, Michel, 1980), які показали, що лейциновий ауксотроф штаму *R.mellott* L5-30 при додаванні екзогенного лейцину до рослин відновлював нормальний розвиток бульбочок, диференціювання бактероїдів і прояв азотфіксуючої активності.

Розбіжність між нашими результатами і цими даними може бути обумовлена, з однієї сторони, особливостями сорту люцерни, який використали ці автори, а з іншої сторони, можливо, що природа мутації, які викликали потребу в лейцині, в нашому штамі СХМІ і в штамі L5-30, з яким працювали французькі дослідники, була абсолютно різною. Природа дефекту в симбіозі, при цьому, залишалась нев'ясною і могла мати три причини: 1) "трофічну" (недостатній для розмноження ауксотрофу T46 рівень лейцину в бульбочках); 2) "сигнальну" (гени біосинтезу лейцину приймають специфічну участь у синтезі молекулярних сигналів, що виробляються ризобіями на ранніх і пізніх стадіях симбіозу); 3) ефект зчепленості генів (існує ген, що контролює розвиток симбіозу, тісно зчеплений з лейциновим локусом).

Крім цього залишалась можливість існування подвійної мутації. Одна - за рахунок власних рухомих генетичних елементів бактерії, а інша - викликана вбудуванням Tn5. Для того, щоб відкинути це припущення лейцинова ауксотрофність мутанту *R.mellott* T46 була комплементована банком генів вихідного штаму *R.mellott* СХМІ.

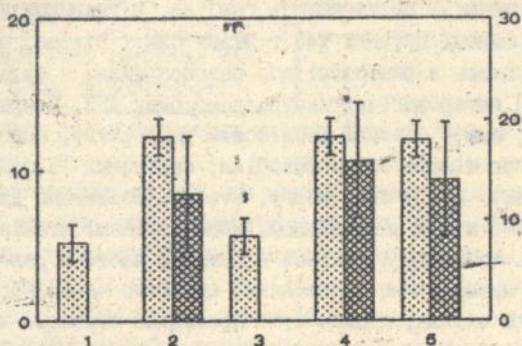
КОМПЛЕМЕНТАЦІЯ ЛЕЙЦИНОВОЇ АУКСОТРОФНОСТІ МУТАНТУ *R.mellott* T46 КОСМІДНИМ БАНКОМ ГЕНІВ. Для комплементациі лейцинової ауксотрофності мутанту *R.mellott* T46 було використано космідний банк генів штаму *R.mellott* СХМІ, створений на основі косміди рLAFR5. Прототрофні транскон'юганти, що виникали при цьому з частотою 10^{-8} клонів/реципієнт були перевірені на утримування рекомбінантних космід за допомогою електрофорезу клітинних лізатів по методу Екхардта (Eckhardt, 1978). Клони, у яких відбулось відновлення здатності рости на мінімальному середовищі, утримували додаткову фракцію екстрахромосомної ДНК, що відповідає розміру рекомбінантних космід, які несуть генетичний матеріал, що комплементує потребу в лейцині у мутанту T46.

Щоб відкинути припущення, що прототрофні транскон'юганти в

ревертантами мутанту T46, із транскон'югантів були виділені рекомбінантні косміди, які використали для трансформації штаму *E. coli* S17-1, а потім перенесли за допомогою кон'югації в лейциновий ауксотроф T46 (частота переносу 10^{-3} клітин/реципієнт). Всі перевірені транскон'юганти були прототрофами, і утворювали нормальні азотфіксуючі бульбочки. Це незаперечно говорить про існування в складі космід гену, який комплементує лейцинову ауксотрофність *R. meliloti* T46. Косміди, що утримували ген біосинтезу лейцину, були, також, введені у штам дикого типу *R. meliloti* СХМІ для перевірки впливу дози *leu* генів на формування симбіозу.

СІМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТОТРОФНИХ ТРАНСКОН'ЮГАНТІВ МУТАНТУ *R. meliloti* T46. Перевірка одержаних в результаті комплементації космідним банком прототрофних транскон'югантів мутанту T46 в умовах стерильного мікровегетативного дослідження виявила, що всі вони на коренях люцерни формують крупні червоні бульбочки з

Мал. I. Азотфіксуюча активність і ефективність штамів *R. meliloti*



1 - неінокульовані рослини; 2 - штам СХМІ; 3 - лейциновий ауксотроф T46; 4 - T46(pLAFR5::leu) (транскон'юганти, одержані на основі мутанту T46); 5 - СХМІ(pLAFR5::leu) (транскон'юганти, одержані на основі штаму СХМІ).

□♦♦♦ - середня маса сухих пагонів рослин (мг); НСР=1,72

□XXXX - редукція ацетилену (нмоль C₂H₄/добу/рослину); НСР=8,1

нормальною азотфіксуючою активністю. Рослини, інокульовані цими транскон'югантами, мали таку ж біомасу і рівень азотфіксації, як і рослини, інокульовані вихідним штамом *R. meliloti* СХМІ. На мал. 1 приведені результати оцінки азотфіксуючої активності (редукція ацетилену) і ефективності (маса сухих пагонів рослин) вихідного штаму СХМІ, мутанту Т46 і прототрофних транскон'югантів.

Косміда рLAPR5 - малокопійна (1-2 копії/клітину бульбочкових бактерій). Тому при введенні рекомбінантних космід в штам "дикого" типу СХМІ утворюються меродиплоїдні по гену біосинтезу лейцину транскон'юганти. Можна було очікувати, що присутність в одній клітині двох копій *leu* гену буде сприяти збільшенню кількості молекулярних продуктів цих генів і, як наслідок цього, підвищенню ефективності симбіозу. Але, як видно із мал.1, меродиплоїдний штам по рівню азотфіксуючої активності і ефективності не відрізнявся від вихідного штаму СХМІ.

СТАБІЛЬНІСТЬ КОСМІД, ЩО УТРИМУЮТЬ ГЕН *leu*, В ТРАНСКОН'ЮГАНТАХ ОДЕРЖАНИХ НА ОСНОВІ МУТАНТУ Т46 І ШТАМУ СХМІ. Відомо, що ризобії, розмножуючись в ризосфері або безпосередньо в бульбочках, можуть губити гетерологічну екстрахромосомну ДНК. Зокрема, плазміда рRK290, яка є базовим репліконом для рLAPR5, може втрачатися з частотою більше 70% в ризобіях, виділених із бульбочок (Williams, 1988). Це, в свою чергу, створює обмеження для використання векторів при направленому конструюванні штамів. Крім цього, досить часто рееструється підвищена частота реверсії ауксотрофних мутацій при пасируванні мутантів через рослину (Pain, 1979). В зв'язку з цим, було проведено скринінг на присутність космідного маркера (стійкість до тетрацикліну) бактерій, виділених із бульбочок, що були утворені штамми *R. meliloti* Т46 (рLAPR5::*leu*) і *R. meliloti* СХМІ (рLAPR5::*leu*). Паралельно проводили оцінку стабільності рекомбінантних космід в транскон'югантах після їх довгострокового зберігання (1,5 місяця) на повних агаризованих середовищах при 6°C. Як видно із табл.3, при довгостроковому зберіганні, транскон'юганти, одержані на основі вихідного штаму СХМІ, значно поступались по здатності

підтримувати рекомбінантну косміду з геном біосинтезу лейцину, транскон'югантам, одержаним після комплементациї лейцинового ауксотрофа T46.

Із даних, представлених в табл.4., можна бачити, що подібна ситуація мала місце при виділенні бактерій із бульбочок. Тільки 7,1% бактерій, виділених із бульбочок, утворених транскон'югантами T46 (pLAFR5::leu), втрачали рекомбінантну косміду. В той же час, для транскон'югантів СХМІ (pLAFR::leu), серед бактерій виділених із бульбочок було знайдено 36,7% клонів, у яких

Табл.3. Стабільність рекомбінантної косміди, що утримує leu ген, в штамі *R.mellotti* СХМІ і мутанті T46 при їх зберіганні на повному агаризованому середовищі.

Штам	Число перевірених клонів	% To ⁸ клонів	2*Sp
СХМІ	100	36	9,6
T46	100	7	5,1

2*Sp - довірчий інтервал долі для 95% рівня вірогідності

відбулась елімінація рекомбінантних космід. Необхідно відмітити індивідуальну мінливість рослини-господаря по ступеню елімінації в бульбочках рекомбінантної косміди і значні відмінності між окремими бульбочками.

Ці дані дозволяють припустити, що різниця між транскон'югантами по стабільності космід, що утримують ген leu, обумовлена їх селективним

значенням для розмноження клітин мутанту T46 як в чистій культурі, так і при взаємодії з рослиною-господарем (тобто, зберіганням прототрофних клітин, що можуть активно розмножуватись). Зрозуміло, що так, як транскон'юганти СХМІ мають дві дози лейцинового гену, то відсутність селекції на підтримання косміди приводить до легкої її втрати. Такі дані не підтверджують гіпотезу про існування в бульбочках селекційних процесів, направлених проти клітин ризобій, що несуть додаткову гетерологічну ДНК.

УЛЬТРАСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ БУЛЬБОЧОК, УТВОРЕНИХ *Rhizobium mellotti* НА КОРЕНЯХ ЛЮЦЕРНИ. Для визначення змін в розвитку симбіозу, що приводять до блоку в формуванні нормальних бульбочок мутантом T46 на рослинах люцерни, було проведено електронномікроскопічне дослідження бульбочок, утворених на коренях люцерни с. Зайкевича після її інокуляції вихідним штамом СХМІ, лейциновим

ауксотрофом T46 і прототрофними транскон'югантами *R.mellott* T46(pLAFR5::leu). Ультраструктурна організація бульбочок, утворе-

них вихідним штамом СХМІ і прототрофними транскон'югантами дуже подібна. В їх цитоплазмі спостерігаються добре розвинуті бактероїди, оточені перибактероїдною мембраною, помітні стінки інфекційних ниток. В той же час, для бульбочок, утворених ауксотрофним полейцину мутантом T46, відзначено руйнування цитоплазми рослинних клітин, пікноз

№ рослини	Кількість перевірених клонів	% Tc ^B клонів на рослину	% Tc ^B клонів на варіант	2*Sp
штам СХМІ				
1	74	38,8	38,7	5,2
2	52	53,7		
3	76	47,5		
4	74	9,5		
5	76	44,2		
мутант T46				
1	52	4,0	7,1	2,8
2	75	8,0		
3	52	11,4		
4	77	8,0		
5	73	4,1		

2*Sp - довірчий інтервал долі для 95% рівня вірогідності

ядер і пластид, присутність зерен крохмалю, абсолютна відсутність бактероїдів і дегенерація інфекційних ниток. Тобто, мутантні бульбочкові бактерії, які проникли в кореневий волосок, формують інфекційну нитку і починається утворення бульбочки. Але, ризобії не виходять в цитоплазму рослинних клітин і гинуть знаходячись в інфекційних нитках.

КЛОНУВАННЯ ЛЕЙЦИНОВОГО ЛОКУСУ *Rhizobium mellott*. Для більш детального аналізу гену біосинтезу лейцину штама СХМІ *R.mellott* було ідентифіковано EcoRI фрагмент ДНК рекомбінантної косміди pLAFR5, що несе даний ген.

При електрофорезі EcoRI рестриктів декількох рекомбінантних космід, одержаних після комплементаци лейцинової ауксотро-

Фності мутанту T46 космідним банком *R.mellott* CXMI, було знайдено "спільний" для всіх космід EcoRI фрагмент довжиною 4,5 т. п.н. Присутність цього спільного фрагменту дозволила припустити, що саме він утримує ген біосинтезу лейцину. В результаті реклоновання цього фрагменту до вектору pSUP202 по EcoRI сайту, що знаходиться в локусі хлорамфеніколарезистентності, були одержані дві плазмідні рSUP202::leu, що утримували leu фрагмент в протилежних орієнтаціях. Фізична карта даного фрагменту представлена на Мал.2.

Мал.2. Фізична карта лейцинового фрагменту *R.mellott* CXMI.

EcoRI,1 HindIII,670 HindIII,2485 XhoI,3650 EcoRI,4559

Після сайту рестрикції для кожної рестриктази вказано місцезнаходження даного сайту.

Для одержання доказу присутності в клонованому фрагменті гену leu було проведено введення плазміді рSUP202::leu в мутант T46 при кон'югації з *E.coli* S17-1 (рSUP202::leu). На повному середовищі, склад якого був доповнений тетрацикліном (маркер рSUP202), несміцином і стрептоміцином (маркери транспозанту T46) з частотою 10^{-4} виростаали транскон'юганти T46 (рSUP202::leu), які при перевірці на мінімальному середовищі всі виявилися прототрофами. В зв'язку з тим, що плазмідя рSUP202 нездатна до реплікації в ризобіях, відібрані транскон'юганти являли собою leu/leu::Tn5 меродіплоїди, які виникли за рахунок одного акту рекомбінації між гомологічними фрагментами. В результаті цього виникає убудова всієї рекомбінантної плазміді в геном мутанту T46, що й забезпечує ріст ауксотрофу на мінімальному середовищі за рахунок присутності в ній непошкодженого алеля leu.

Інший доказ присутності в реклонованому фрагменті гену leu із *R.mellott* було одержано за допомогою блот-гібридизації по Саузерну EcoRI рестриктованої тотальної ДНК вихідного штаму CXMI, мутанту T46 і прототрофних транскон'югантів *R.mellott* T46 (рLAFR5::leu) з реклонованим фрагментом. В результаті гібри-

дизації було показано, що EcoRI фрагмент розміром 4,5 т.п.н. штаму СХМІ гібридується з радіоактивним зондом (³²P-pSUP202::leu), в той час як у мутанта Т46 спостерігається гібридизація з фрагментом 10,5 т.п.н. Це пояснюється тим, що у мутанта Т46 у фрагмент в лейциновим геном вбудований транспозон Tn5, довжина якого складає близько 6 т.п.н. (Tn5 не має в своєму складі EcoRI сайтів). У прототрофних трансформантів мутанта Т46 гібридизуються 2 фрагменти. Верхній із них (10,5 т.п.н.) - це leu::Tn5, а нижній - це leu фрагмент косміди pLAFR5::leu. Після цього можна вважати незаперечно доведеним факт клонування гену, що відповідає за біосинтез лейцину штаму *Rhizobium meliloti* СХМІ.

Насьогодні відомо, що бактерії *R. meliloti* звичайно мають декілька лейцинових локусів на хромосомі (Klein, 1992). З метою перевірки цього положення для *R. meliloti* СХМІ лейцинові косміди pLAFR5::leu і плазмиду pSUP202::leu вводили в його деривати *R. meliloti* Т5II/6 і Т9I8/6, дефектні по синтезу лейцину. У всіх випадках лейцинова ауксотрофність мутанту Т5II/6 не була комплементована, тоді як введення цих плазмід у склад мутанта Т9I8/6 приводило до відновлення здатності до росту на мінімальному середовищі без додавання екзогенного лейцину, що говорить про існування у *R. meliloti* двох або більше лейцинових локусів, які кодують неідентичні гени.

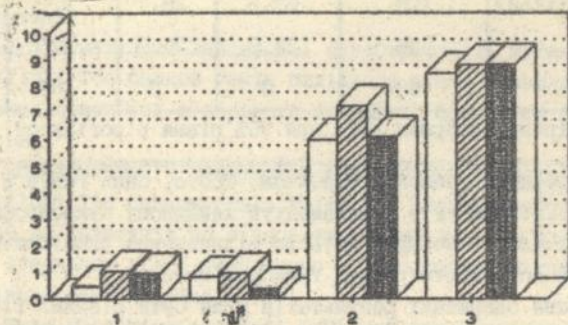
Для вивчення впливу дози leu генів на симбіотичні властивості бульбочкових бактерій люцерни, leu фрагмент плазмиди pSUP202::leu було реклоновано в здатну до реплікації в ризобіях багатокопійну (100-200 копій/клітину) плазмиду pSUP104 по EcoRI сайту. Плазмиди pSUP104::leu була введена в штам СХМІ. Цей дериват використали у вегетаційному досліді. Рівень ацетиленредукції у штаму СХМІ (pSUP104::leu) виявився навіть нижчим ніж у штаму *R. meliloti* 425a (штам СХМІ в Str^r дериватом штаму 425a) і знаходився на рівні з контролем без інокуляції (бульбочки на коренях контрольних рослин були утворені спонтанними расами бульбочкових бактерій).

Достовірного підвищення або зниження сухої маси рослин у порівнянні з штамом 425a не спостерігалось (див. Мал.3).

КОМПЛЕМЕНТАЦІЯ ЛЕЙЦИНОВОЇ АУКСОТРОФНОСТІ *Rhizobium meliloti* Т46

БАНКОМ ГЕНІВ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. Відсутність комплементарії розвитку симбіозу при додаванні екзогенного лейцину до середовища росту рослин, інокульованих ауксотрофом T46 дозволила зробити припущення про існування поблизу лейцинового локусу гену, що відповідає за утворення симбіозу. З метою перевірки цього положення лейцинова ауксотрофність мутанту T46 була комплементована банком генів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39, побудованим на основі косміди pLAFR1. Одержані в результаті комплементарії клони *R.mellott* T46(pLAFR1::leu) несли косміди pLAFR1::leu з спільним BooRI фрагментом довжиною 6 т.п.н. При повторному введенні даних космід в ауксотроф T46

Мал.3. Азотфіксація (мм $\text{C}_2\text{H}_4/\text{год.}/\text{рослину}$) і ефективність (г сухої маси пагонів рослин люцерни с.Бореале 47) штаму СХМІ з уведеною в нього багатокопійною плазмідом pSUP104::leu у вегетаційному досліді в посудинах.



□ - контроль без інокуляції; ▨ - інокуляція штамом *R.mellott* 425a; ■ - інокуляція штамом *R.mellott* СХМІ (pSUP104::leu); I - середня маса сухих рослин (НСР=0,32); I* - середня азотфіксація коренів (НСР=0,47); 2 - середня маса сухих рослин першого укосу (НСР=5,67); 3 - середня маса сухих рослин другого укосу (НСР=8,06)

із *E.coli* S17-1 (pLAFR5::leu) з частотою 10^{-1} клітин/реципієнт виникали прототрофні транскон'юганти. Вивчення цих транскон'юганти в мікроевектаційному досліді показало, що більшість рослин не утворює бульбочки на люцерні (Табл.5), але 3,7% рослин формувало велику кількість дрібних слабо-рожевих бульбочок, які не фіксували азот. Маса їх сухих пагонів не відрізнялась від контрольних рослин. Вихідний штаб *R.melloti* СХМІ на всіх рослинах формував нормальні, розові, азотфіксуючі бульбочки, і суха маса пагонів була вірогідно вище ніж у варіанті з Т46 або

Табл.5.Здатність прототрофних транскон'югантив Т46 (pLAFR1::leu) утворювати бульбочки на люцерні с.Зайкевича.

Штам бульбочкових бактерій	Кількість перевічених рослин	Кількість рослин, %			2*S _p
		без бульбочок	з бульбочками		
			білими	рожевими	
Т46 (pLAFR1::leu)	108	67,6	28,7	3,7	3,7
Т46	36	25,0	75,0	0	14,4
СХМІ	36	0	0	100	

2*S_p - довірчий інтервал долі для 95% рівня вірогідності

його прототрофними транскон'югантами. Тобто, банк генів *R.leguminosarum* bv. *viciae* VF39 комплементує лейцинову ауксотрофічність мутанта Т46, але це не приводить до відновлення симбіотичних властивостей його прототрофних транскон'югантив.

Пояснення одержаних результатів може бути різним: 1. Вбудова транспозону в локус одного з генів біосинтезу лейцину приводить (за рахунок полярного ефекту) до інактивації якогось симбіотичного гену, що знаходиться в безпосередній близькості до leu гену. Це пояснення найбільш вірогідне і задовольняє всім вищеприведеним фактам; 2. Фермент, який бере участь в біосинтезі лейцину і в інактивованім у мутанті *R.melloti* Т46 має подвійну функцію, і може синтезувати не тільки один із попередників лейцину, але й якийсь фактор, що необхідний для утворення симбіозу. Цей фермент має структурні відмінності у порівнянні з

аналогічним ферментом бульбочкових бактерій вики. Тому, при перенесенні "лейцинового" ферменту бульбочкових бактерій вики в мутант T46 бульбочкових бактерій люцерни (в результаті комплементациі лейцинової ауксотрофності *R. meliloti* T46 банком генів *R. leguminosarum* bv. *viceae* VF36) він не має здатності синтезувати якийсь фактор, необхідний для утворення симбіозу; 3. Ці структурні відмінності приводять до зниження синтезу лейцину прототрофними транскон'югантами. Рівень лейцину при цьому залишається достатнім для росту на мінімальному середовищі, але недостатнім для відновлення симбіотичних властивостей.

ВИСНОВКИ.

1. Мутація, викликана вбудуванням транспозону Tn5 в локус біосинтезу лейцину штаму *Rhizobium meliloti* CXMI приводить до ауксотрофності за лейцином і блокування розвитку азотфіксуючого симбіозу з люцерною (*Medicago sativa*). Мутантні бульбочкові бактерії *Rhizobium meliloti* T46 нездатні виходити із інфекційних ниток в клітини кореню рослин і гинуть знаходячись в інфекційних нитках.

2. Комплементациа лейцинової ауксотрофності мутанта *Rhizobium meliloti* T46 банком генів вихідного штаму приводить до відновлення здатності створювати нормальні бульбочки на рослинах люцерни.

3. Комплементациа лейцинової ауксотрофності мутанта *Rhizobium meliloti* T46 банком генів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* VF39 не приводить до відновлення симбіозу, що може вказувати на існування тісно зчепленого з лейциновим локусом гену, який "відповідає" за симбіоз.

4. Штам *Rhizobium meliloti* CXMI має два незчеплених лейцинових локуси.

5. Існує велика індивідуальна мінливість рослин люцерни в межах сортів Зайкевича, Вахшська 233, Вега і Марусинська 425 за здатністю утворювати бульбочки при інокуляції ауксотрофним за лейцином мутантом T46.

6. Створення меродиплоїдних і поліплоїдних по лейциновому локусу штамів не приводить до підвищення азотфіксуючої активності і ефективності. При цьому рекомбінантні косміди з лейци-

новим локусом в штамі СХМІ проявляють значно знижену стабільність як у вільноживучих бактеріях, так і в бульбочках у порівнянні з прототрофними транскон'югантами, одержаними на основі лейцинового ауксотрофу.

7. Експериментально доведено, що лейциновий локус бульбочкових бактерій люцерни функціонально важливий для формування симбіозу *Rhizobium meliloti* - *Medicago sativa*.

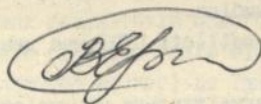
СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСКРТАЦІЇ.

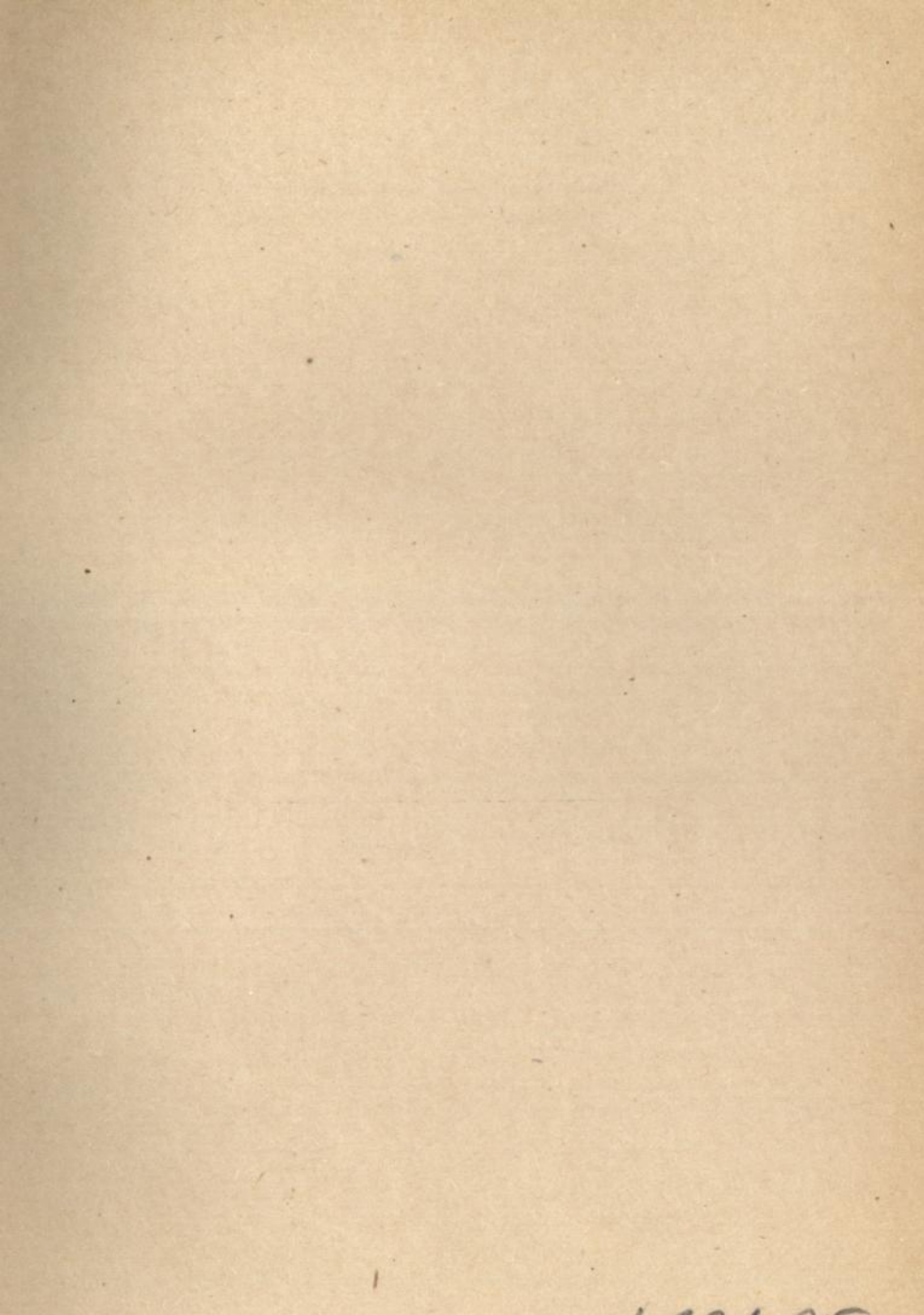
1 Лебский В.К., Аронштам А.А., Умаров Б.Р., Ерко В.Н., Расулов А.С., Халмурадов А.Г. Молекулярно-генетический анализ симбиотических свойств *Rhizobium meliloti*// Доклады АН СССР.-1992.-324, N1, -С.224-226.

2. Умаров Б.Р., Ерко В.Н., Аронштам А.А., Расулов А.С., Халмурадов А.Г. Молекулярное клонирование гена биосинтеза лейцина у *Rhizobium meliloti*, участвующего в контроле развития азотфиксирующего симбиоза с люцерной// Доклады АН СССР.-1992.-324, N2.- С.469-470.

3 Аронштам А.А., Умаров Б.Р., Ерко В.Н., Андронов Е.Е. Симаров Б.В. Использование космидного банка генов *Rhizobium meliloti* для клонирования гена биосинтеза лейцина, участвующего в контроле развития азотфиксирующего симбиоза с люцерной// Генетика.-1993.-29, N2.-С.235-245.

4. Ерко В.Н., Старченков Е.П. Комплементация лейциновой ауксотрофности *Rhizobium meliloti* банком генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* VF39// Физиология и биохимия культурных растений.-1994.-26, N3.-С.240-245.





AB 29.782