

ОГЛЯДИ

УДК 579.841.3:579.262:575.224.4

ТРАНСПОЗОНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ НОВИХ ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ

© 2009 р. С. Я. Коць, В. М. Мельник, В. К. Даценко

Інститут фізіології рослин і генетики

Національної академії наук України

(Київ, Україна)

Подано загальну характеристику генетичних та біотехнологічних підходів, які використовуються при селекції ризобій. На основі аналізу літературних даних і результатів власних досліджень показано переваги транспозонового мутагенезу над іншими методами при селекції нових штамів бульбочкових бактерій, його значення та перспективи використання у роботі із бульбочковими бактеріями.

Ключові слова: *транспозоновий мутагенез, Tn5-мутанти, бульбочкові бактерії, бобово-ризобіальний симбіоз*

Інтенсифікація біологічної фіксації молекулярного азоту бобовими рослинами за рахунок мікроорганізмів-азотфіксаторів є особливо актуальною у сучасних умовах розвитку сільськогосподарського виробництва, оскільки передбачає зниження енергетичних витрат і зменшення негативного впливу мінеральних добрив на навколишнє середовище. Проте, взаємодія партнерів симбіозу не завжди характеризується високою активністю фіксації азоту атмосфери. Відомо, що рівень ефективності бобово-ризобіальних систем визначається генотипами обох партнерів – бульбочкових бактерій і рослини-хазяїна. Тому поряд із спрямованою селекцією сортів бобових рослин (Тихонович, Проворов, 1998), потрібно постійно вести добір нових комплементарних їм перспективних штамів ризобій із покращеними симбіотичними властивостями (Антипчук, 1994; Коць і др., 2007; Патица та ін., 2003; Фізіолого-біохімічні..., 2001).

Генетичні дослідження представників родини *Rhizobiaceae* почалися ще в 50-х роках

минулого століття і охоплювали експерименти з трансформації бактерій – передачі генетичної інформації від клітин-донора до клітин-реципієнта за допомогою очищених препаратів ДНК. Пізніше у цих мікроорганізмів була виявлена здатність до кон'югації, тобто до перенесення ДНК між бактеріями при їх безпосередньому контакті. Тоді ж були виділені різні типи ризобіальних мутантів. У 70–80-х роках ХХ століття роботи з вивчення генетики ризобій активувалися. Було розроблено ряд методів молекулярної генетики й генної інженерії, використання яких дозволило виявити основні риси структурно-функціональної організації симбіотичних ризобіальних генів і розпочати аналіз механізмів їхньої експресії в процесі взаємодії бактерій з рослиною-хазяїном (*Rhizobiaceae*, 2002). Незважаючи на те, що подальше вивчення ризобій було спрямоване, в основному, на дослідження механізмів симбіотичної азотфіксації, воно привело до багатьох важливих відкриттів, що стосувалися природи бактеріального геному, і до створення ряду генетичних підходів і методик.

Нині традиційно виділяють три основних методи перенесення генів між бактеріями: трансформацію, трансдукцію і кон'югацію. Вияв-

Адреса для кореспонденції: Коць Сергій Ярославович, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна;
e-mail: plant@ifrg.kiev.ua

ТРАНСПОЗОНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ

лено, що деякі штами бульбочкових бактерій компетентні до трансформації – стабільного включення в бактеріальну клітину поглинутої ДНК, кількість якої зазвичай не перевищує 5 % геному штаму-донора (Прозоров, 1999). Саме завдяки використанню цього методу були одержані перші відомості про зчеплення ризобіальних генів і здійснене перше перенесення спадкових факторів, що контролюють симбіотичні ознаки. Використовуючи очищені препарати ДНК, Балаша (Balassa, 1963) за допомогою трансформації вперше продемонструвала можливість передачі від штаму-донора штам-реципієнтам різних властивостей, а саме: стійкості до антибіотиків, здатності до синтезу клітинних метаболітів, а також окремих симбіотичних властивостей, зокрема, господарської специфічності та ін.

Зарецька (Зарецкая, 1976) показала можливість використання трансформації для підвищення активності бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti*. Пасирування трансформованих ризобій через рослини люцерни дозволило відібрати ті з них, які характеризувалися високою азотфіксуючою активністю.

Необхідною умовою проведення генетичної трансформації є одержання у штаму-реципієнта клітин, здатних поглинати ДНК штаму-донора, що може бути досягнуто шляхом створення клітин із порушеннями поверхневих структур. Метод трансформації було призначено для передачі в клітини бульбочкових бактерій плазмід, проте частота трансформації при цьому виявилася дуже низькою, у зв'язку з чим він використовується в генетиці бактерій досить рідко (Єрко, 1998). На думку ряду дослідників, недоліком цього методу може бути низька відтворюваність отриманих результатів. Водночас з'явилися нові методи, зокрема, кон'югація що забезпечує ефективніше введення плазмід в ризобії (*Rhizobiaceae*..., 2002).

Існують дані про можливість передачі ДНК у бульбочкові бактерії шляхом електропорації. Цей підхід полягає у створенні під дією короткочасного сильного електричного імпульсу мікропор у мембранах бактерій, що полегшує проникнення екзогенних генетичних конструкцій усередину клітини (Modern, 2002). Зараз електропорація широко використовується для введення плазмід в агробактерії, показана можливість її застосування для перенесення хромосомних маркерів між різними штамми (Charles, 1994).

Більш дієвим методом у генетичних дослідженнях бульбочкових бактерій порівняно з трансформацією виявилася трансдукція. Це метод перенесення генетичного матеріалу від штаму-донора до штаму-реципієнта за допомогою бактеріофагів. У бульбочкових бактерій виявлено специфічну трансдукцію, коли фаг переносить чітко визначений фрагмент бактеріальної хромосоми, і загальну або неспецифічну, коли відбувається передача довільної ділянки геному штаму донора (Modern, 2002). В обох випадках фрагмент бактеріальної ДНК, що переноситься, невеликий, і обмежується розмірами бактеріофага. Зокрема, для фагів бульбочкових бактерій він не перевищує 120–150 МДа. Це дозволило використовувати даний метод для детального картування лише невеликих ділянок геному ризобій (Єрко, 1998).

У *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* і *S. meliloti* використання трансдукуючих фагів виявилось ефективним при конструюванні штамів, що несуть множинні мутації. Було охарактеризовано і створено фізичну й генетичну карти фага, що лізогенізує штам Rm41 *S. meliloti*, ідентифіковано та секвеновано сайти його прикріплення, що привело до створення векторів, які забезпечують стабільну інтеграцію поодиноких генів за допомогою Rm41 (Dorgai et al., 1993). Трансдукція широко використовується для внутрішньогенного картування мутацій, а також для функціонального тесту на алелізм (Прозоров, 1999).

Одним із способом перенесення рекомбінантних плазмід у *Rhizobiaceae* є кон'югація. Цей метод використовують для створення генетичних карт штамів, перенесення симбіотичних, онкогенних та інших плазмід між штамми, а також для введення транспозонів із *Escherichia coli* в ризобії. Кон'югація забезпечує перенесення досить великих фрагментів бактеріального геному і може застосовуватися для з'ясування відносного розташування на плазмідах чи хромосомі далеко розміщених один від одного генів, між якими не відбувається зчеплення при трансформації і трансдукції (Modern, 2002).

Протягом тривалого часу головним обмеженням при проведенні генетичних маніпуляцій у бульбочкових бактеріях була відсутність у них власних F-факторів (факторів фертильності), які можуть мобілізувати до перенесення некон'югативні плазмиди або хромосому. Його вдалося подолати, використовуючи R-плазмиди широкого кола господарів, що належать до IncP, IncW, IncQ груп несумісності та

реплікуються в бактеріях *Rhizobiaceae* (Dericker, 1980)..

Методом міжродової кон'югації були отримані нові штами *S. meliloti*, досліджено їх вплив на симбіотичні ознаки та біометричні показники рослин-симбіонтів, а також вивчено здатність реізолятів із бульбочок зберігати маркери стійкості до антибіотиків тетрацикліну, канаміцину і стрептоміцину (Воробей, 2005; Ничик и др., 1992).

Крім описаних вище основних методів для отримання мутантів ризобій використовують фізичний і хімічний мутагенез, застосовуючи як мутагени найчастіше відповідно ультрафіолетові (УФ) промені і нітрозогуанідин (Федоров, Зарецкая, 1978; Федоров, Симаров, 1987). За допомогою останнього Злотников та співавт. (Злотников и др., 1983) виділили ауксотрофні мутанти у *Bradyrhizobium japonicum* і *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*. Частота появи мутантів за дії нітрозогуанідину становить 2–3 %, але у бактерій в процесі мутагенезу він викликає множинні пошкодження геному, що ускладнює наступний генетичний аналіз отриманих мутантів (Симаров и др., 1990).

Чернова та співавт. (Чернова и др., 1986) методом УФ-мутагенезу отримали невірулентні мутанти *S. meliloti*, у яких мутації відбулися в генах, відповідальних за різні стадії становлення симбіозу. При аналізі цих мутантів можна виявити, порушення яких генетичних детермінант пов'язане із втратою вірулентності. Проте проведення УФ-мутагенезу у ризобій ускладнене наявністю потужних систем фотореактивації, які при дії на клітини видимого світла повністю знімають мутагенний ефект. Крім того, більшість штамів екстрагують велику кількість екзополісахаридів, які активно поглинають УФ-промені і склеюють бактеріальні клітини, чим ускладнюють отримання окремих клонів (Симаров и др., 1990).

Донедавна при одержанні нових штамів ризобій найуживанішим був метод аналітичної селекції, який базується на відборі цих бактерій із природних популяцій (тобто безпосередньо з бульбочок рослин, рідше – з ґрунту) і подальшій їх перевірці на інтенсивність азотфіксації, вірулентність, конкурентоздатність, стійкість до несприятливих факторів довкілля в умовах симбіозу з різними сортами специфічних їм рослин (Доросинский, 1970). Було виявлено (Шапошников и др., 1975), що найбільш активні й ефективні штами ризобій можна виділити з багатих, добре окультурених ґрунтів, зокрема чор-

ноземів. Бульбочкові бактерії, виділені з нейтральних ґрунтів, є більш ефективними, ніж ізолювані з кислих. У дослідженнях Антипчук і співавт. штами бульбочкових бактерій, одержані методом аналітичної селекції, за ефективністю перевищували вихідні не більше, ніж на 15–20 % (Антипчук и др., 1985).

Отже, використання згаданих вище методів при вивченні генетики бульбочкових бактерій має ряд суттєвих недоліків. Це спонукало до вдосконалення існуючих та пошуку нових методичних підходів для створення нових штамів ризобій із контрастними симбіотичними властивостями, відмінних за культурально-морфологічними та генетичними ознаками.

Одним із таких ефективних сучасних методів отримання штамів бульбочкових бактерій є транспозоновий мутагенез, використання якого має ряд переваг порівняно із застосуванням традиційних підходів у селекції ризобій (Симаров и др., 1990; Тихонович, Пропоров, 2005). Перш за все, транспозоновий мутагенез дає можливість одержання саме поодиноких нереверсивних мутацій, що полегшує подальший генетичний аналіз отриманих мутантів і сприяє вирішенню низки наукових завдань, пов'язаних із дослідженнями процесу симбіотичної азотфіксації. Крім того, перевагою цього методу при роботі з бульбочковими бактеріями є те, що транспозон, який вбудовується в ген-мішень, несе маркер стійкості до антибіотика, за допомогою якого випадки транспозиції можна легко виділити селекцією на зумовлену транспозоном стійкість (Hayes, 2003).

Транспозоновий мутагенез – це метод індукування за допомогою транспозонів інсерційних мутацій у випадкових ділянках ДНК-мішеней. Транспозони – це сегменти ДНК, які здатні до внутрішньо- або міжхромосомних переміщень. Вони можуть переносити фрагменти генетичного матеріалу і генерувати в ДНК плярні мутації, делеції та інверсії, а також “вмикати” і “вимикати” сусідні гени за рахунок наявності промоторів і термінаторів транскрипції (Guilhbert, 2001; Reznikoff, 1993). Завдяки цим властивостям транспозони здійснюють регуляцію активності генів і диференціювання клітин. Транспозони відкриті в 40-х роках ХХ ст. Барбарою МакКлінток під час досліджень різних типів мутацій у кукурудзи (Comfort, 2001). У 60–70-х роках минулого століття вони були виявлені у бактеріях, після чого їх почали широко використовувати як дієвий інструмент у генетичних маніпуляціях.

ТРАНСПОЗОНИЙ МУТАГЕНЕЗ

Транспозони крім рослин виявлено в *Eubacteria*, *Archaea* і *Eukarya*, а також у тварин і людини, їх активно використовують у процесі генетичного та молекулярного аналізу різних бактерій (Guilhabert et al., 2001; Voelker, 1998). Із появою нових технологій у молекулярній біології, таких як швидке секвенування нуклеотидів і сайт-спрямований мутагенез, інтерес до транспозонів дещо знизився. Проте в останні роки використання цих елементів у генетичних дослідженнях бульбочкових бактерій зросло, про що свідчить ряд робіт, виконаних у світі й Україні (Воробей и др., 2004; Маліченко та ін., 2005; Karr, 2000; Marroqui et al., 2001).

Для переміщення транспозонів від клітини-донора застосовують вектори-“самогубці”, які переносять їх у реципієнтні клітини, де відбувається їх гомологічна рекомбінація з репліконом, у результаті чого вектор втрачає свою життєздатність й елімінується. Першим у роботі з бульбочковими бактеріями використовували вектор рJB4JI, сконструйований на основі плазмиди рPH1JI (Beringer et al., 1978). Проте він мав істотний недолік, оскільки містив фаг, який активував власні інсерційні послідовності (IS-елементи) реципієнта і вбудовувався в його геном разом із транспозоном, що ускладнювало подальші генетичні дослідження (Симаров и др., 1990).

Для ефективного використання векторів-“самогубців” на основі *E. coli* були отримані плазмиди з вузьким спектром господарів, такі як рBR322, рBR325, рACYC177 і рACYC184. За допомогою цих плазмід Сімон та співавт. під керівництвом Пюлера створили систему векторів SUP, які мобілізуються з високими частотами в *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* та інших бактеріях, але не здатні до реплікації в цих клітинах (Simon et al., 1983; 1986).

У дослідженнях генетичного апарату ризобій найбільш широко використовують транспозон Tn5, який може вбудовуватися в будь-який фрагмент бактеріального геному, викликаючи при цьому широкий спектр поодиноких мутацій (Симаров и др., 1990; Reznikoff, 1993). На прикладі транспозонових мутантів *B. japonicum* USDA 110 показано, що ефективним методом ідентифікації наявності Tn5 в досліджуваних генах є метод полімеразної ланцюгової реакції (Kwon, Ricke, 2000).

Tn5 – складний транспозон, який містить дві обернено орієнтовані копії IS50-елемента, розділені між собою генами, які кодуєть стійкість до канаміцину (Km), блеоміцину і стреп-

томіцину (Str). Один із елементів – IS50R – кодує активні білки, необхідні для транспозиції, інший – IS50L – продукує скорочені, неактивні копії цих білків. IS50R бере участь в утворенні транспозази – ферменту, що активує початкові етапи транспозиції при перенесенні мобільних генетичних елементів (Goryshin et al., 2000; Goryshin, Reznikoff, 1998; Reznikoff, 1993; 2003). Під час кон'югації між *E. coli* і *Rhizobium* плазмиди, що містять Tn5, елімінуються з клітин штаму-реципієнта, а транспозон із частотою 10^{-5} – 10^{-7} на клітину включається в геном бульбочкових бактерій. При цьому індуктовані транспозоном мутанти зазвичай виділяють шляхом селекції на стійкість до канаміцину. Донорні клітини *E. coli* можуть бути контрселектовані будь-якими антибіотиками, до яких є хромосомно кодована стійкість у реципієнта (Beringer et al., 1978).

Ефективність транспозонового мутагенезу можна перевірити шляхом визначення кількості ауксотрофних мутантів. Частота виникнення мутантів із втраченою здатністю рости на мінімальному середовищі зазвичай становить 0,5–3,0 %. При використанні векторів серії SUP частота індукції ауксотрофних мутантів досягає 3 %, що перевищує в три і більше разів частоти мутацій, які спостерігаються при використанні вектора рJB4JI або при проведенні у ризобій фізичного чи хімічного мутагенезу (Симаров и др., 1990).

Крім Tn5, у дослідженнях бактерій використовують й інші транспозони, проте більшість з них мають недоліки, пов'язані з невідповідністю вставки в геном реципієнта, утворенням делецій, нестабільністю маркерів стійкості до антибіотиків. Так, застосування в генетиці ризобій транспозона Tn7 обмежене тим, що він вбудовується лише в певні ділянки їх геному, а використання Tn1 – відсутністю експресії гена стійкості до ампіциліну, що входить до його складу (Hayes, 2003).

Нині в університеті Білефельд (Німеччина) створено банк, який налічує 412 мічених транспозонів. Для того, щоб досягти високої специфічності визначення мітки, кожен із цих транспозонів помічений двічі (Pobigaylo et al., 2006).

Після відкриття транспозонів і розробки методу транспозонового мутагенезу його активно почали використовувати у дослідженнях із бульбочковими бактеріями.

Відомо, що аналіз симбіотичних ознак бульбочкових бактерій ускладнений тим, що

гени, які контролюють їх взаємодію з макросимбіонтом, не виявляють своєї дії у чистих культурах бактерій, тому вивчення їхніх властивостей можливе лише за умов симбіозу (Тихонович, Пропоров, 1998). Застосування транспозонового мутагенезу у дослідженнях із ризобіями дозволяє маркувати гени, що не мають самостійного фенотипового прояву, відкриваючи тим самим можливість з'ясування окремих ланок механізму формування симбіотичних взаємовідносин між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями. Крім того, частота появи мутантів ризобій зі зміненими культурально-біохімічними і симбіотичними ознаками при використанні цього методу вища, ніж за умови застосування інших методів. Це надає більше шансів для отримання нових штамів бульбочкових бактерій із покращеними симбіотичними властивостями для створення ефективних азотфіксуючих систем.

Більшість симбіотичних генів, що відповідають за становлення й функціонування симбіозу, в основному картується на плазмідах. За допомогою системи вектора pSUP5011 з Tn5-тоб було проведено маркування симбіотичної плазмиди pSym1-32 високоефективного штаму *R. leguminosarum* bv. *viciae* при перенесенні її в неефективні, нездатні до азотфіксації штами. Показано, що плазміда pSym1-32 несе гени, що контролюють азотфіксуючу активність, ефективність симбіозу, конкурентоздатність і стійкість до кислотності у *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Можливість передачі плазмиди, що містить генетичні детермінанти, може бути застосована при конструюванні господарсько-цінних штамів бульбочкових бактерій (Курчак и др., 2001). Вектор-“самогубець” pSUP2111, який містив Tn5, був використаний для вивчення функцій плазмид, що несуть гени, відповідальні за становлення симбіозу, в двох штамів *Rhizobium galegae* (Софронова, Новикова, 1994).

Відомо, що необхідною умовою формування ефективних симбіотичних систем ризобії-бобові рослини є висока конкурентоздатність активних штамів бульбочкових бактерій. Дослідження транспозонових мутантів *S. meliloti* з різним рівнем нодуляційної, ризосферної та сапрофітної конкурентоздатності дали змогу встановити наявність у цих мікроорганізмів різних генних систем, які визначають виживання їх в екологічних нішах *in planta* та *ex planta* (Онищук и др., 2001).

За допомогою Tn5-мутагенезу були отримані ліпополісахаридні мутанти *S. meliloti*

штаму СХМ1-188, які характеризувалися зниженою конкурентоздатністю відносно батьківського штаму. Отримані результати свідчать про важливість ліпополісахаридів ризобій люцерни для прояву конкурентоздатності цих бактерій (Затовская и др., 1998). Різке зниження нодуляційної конкурентоздатності спостерігали у Tn5-мутанта *Rhizobium etli*, який характеризувався підвищеною гідрофобністю, що також була пов'язана зі змінами синтезу або екскреції ліпополісахаридів (Lagares et al., 1990).

Використовуючи Tn5-мутанти *Bradyrhizobium* spp. Скотті зі співавт. (Scotti et al., 1997) досліджували електрофоретичні профілі полісахаридів бульбочкових бактерій, що формували симбіотичні системи із соєю. Аналіз Tn5-мутантів *R. etli* показав, що транспозон вбудувався в гени, відповідальні за синтез метіоніну (Taté et al., 1999) і аргініну (Ferraioli et al., 2001). У результаті отримані мутанти втратили здатність продукувати ліпохітоолігосахариди й індукувати утворення бульбочок на коренях *Phaseolus vulgaris* (Ferraioli et al., 2001; Taté et al., 1999).

При проведенні Tn5-мутагенезу з використанням вектора pSUP5011 були отримані мутанти *S. meliloti* зі зміненим синтезом капсульних і ліпополісахаридів та зниженою здатністю конкурувати з батьківським штамом за адсорбцію на коренях, у результаті чого виявлено нові гени ризобій, що контролюють синтез поверхневих полісахаридів і симбіотичну активність (Онищук и др., 2005).

За допомогою Tn5-мутагенезу отримано мутанти швидкорослих бульбочкових бактерій сої *Rhizobium fredii* зі зменшеним синтезом загальної кількості екзополісахаридів та погіршеними симбіотичними властивостями порівняно з батьківським штамом (Ko, Randall, 1990).

Як зазначалося раніше, існує велика група ризобіальних генів, які контролюють формування та функціонування симбіозу. Проте відсутність фенотипового прояву цих генів у вільноіснуючих клітинах бульбочкових бактерій істотно ускладнює отримання високоефективних мутантів. Тому за допомогою Tn5-мутагенезу штаму СХМ1-188 *S. meliloti* була отримана колекція транспозонових мутантів із підвищеним клітинним редокс-потенціалом. Запропонована методика проведення спрямованого відбору ризобіальних мутантів із підвищеною симбіотичною ефективністю за Red⁺⁺-фенотипом, що легко тестується в чистій культурі (Юргель и др., 1998).

ТРАНСПОЗОНИЙ МУТАГЕНЕЗ

Фрагменти ДНК Tn5-мутанта штаму СХМ1-188 *S. meliloti*, дефектного за симбіотичними властивостями, були клоновані і секвеновані з використанням Tn5-праймерів. Припускають, що виявлений в результаті цього ген SMa1514, а можливо і локус, в якому він розташований, необхідні для функціонування симбіозу *S. meliloti* з люцерною (Румянцева и др., 2008).

У результаті проведення Tn5-мутагенезу штаму СХМ1 *S. meliloti* побудовані генетичні карти двох віддалених один від одного регіонів мегаплазміди-2, на якій локалізовано гени, що відповідають за симбіотичну ефективність бульбочкових бактерій люцерни (Чижевская и др., 1998).

За допомогою транспозонних мутантів вивчена роль структурних компонентів бактеріальної клітини при формуванні симбіотичних азотфіксуючих систем (Breedveld et al., 1995; Noel et al., 2000), а також на прикладі Tn5-мутанта FAJ1200 *R. etli* CE3 була показана важливість О-ланцюгів ліпополісахаридів бульбочкових бактерій при інфікуванні коренів бобових (Lerouge et al., 2001).

Транспозонні інсерції в генетичний апарат ризобій дозволяють розширити спектр рослин-господарів. Так, при застосуванні цього методу у штаму USDA257 *R. fredii* отримані Tn5-мутанти, які, на відміну від вихідного штаму, можуть вступати в ефективні симбіотичні взаємовідносини з трьома сортами сої [45].

Показано, що Tn5-мутант *S. meliloti*, котрий викликав зниження активності піруватдегідрогенази, формував із рослинами люцерни симбіотичні системи, які характеризувалися низькою симбіотичною активністю. Це свідчить про участь даного ферменту у метаболізмі продуктів фіксації молекулярного азоту рослинами (Soto et al., 2001). Із використанням транспозона Tn5tac1 при проведенні мутагенезу у *S. meliloti* вперше отримано дефектний за синтезом малатдегідрогенази мутант (Думов et al., 2004).

Методом транспозонного мутагенезу з використанням як донора Tn5 плазміди рSUP2021 одержано ауксотрофний за лейцином мутантний штам *S. meliloti* СХМ1. Здійснено клонування, ідентифікацію, реклонування у різні вектори і фізичне картування локусу, що відповідає за біосинтез лейцину. Таким чином доведена його участь у формуванні азотфіксуючого симбіозу бактерій із люцерною (Аронштам и др., 1993).

Tn5-індукованим мутагенезом у *R. etli* вдалося ідентифікувати деякі гени, відповідальні за утилізацію глютаміну, в тому числі за кодування переносників амінокислот і глютаматдегідрогенази. Ізольовані мутанти були охарактеризовані шляхом аналізу їх здатності рости на різних середовищах, транспортувати і утилізувати глютамін як джерело вуглецю (продукція CO₂ з глютаміну). Показано, що гени, включені в транспорт глютаміну, не є важливими для здатності бактерій індукувати розвиток бульбочок, проте вони необхідні при глюконеогенезі і біосинтезі нуклеотидів (Tatè et al., 2004).

Шляхом транспозонного мутагенезу вдалося отримати мутант Tr63 *S. meliloti* штаму СХМ1-188, що містив інсерцію транспозона Tn5 в ген SMc02082. Встановлено, що саме цей ген кодує протеїн, гомологічний протеїну TolC, що є компонентом секреторної системи I типу і слугує для експорту білкових токсинів і протеаз у грамнегативних бактеріях. Отриманий мутант, на відміну від батьківського штаму, втратив здатність формувати ефективний симбіоз із рослинами люцерни (Затовская и др., 2007).

При введенні mini Tn5 у штам *S. meliloti* (CE52G) отримано мутант, який, на відміну від батьківського вихідного штаму, не здатний до синтезу меланіну (Castro-Sowinski et al., 2007), що, як відомо, бере участь в детоксикації фенольних сполук у бульбочках і коренях бобових рослин (Castro-Sowinski et al., 2002). Отриманий мутантний штам формував неефективний симбіоз із рослинами люцерни (Castro-Sowinski et al., 2007).

Шляхом селекції на кислому середовищі отримано Tn5-мутанти *R. leguminosarum*, які використовували для дослідження кислотостійкості бактерій (Chen et al., 1993). Були ізольовані кислоточутливі Tn5-мутанти штаму *Rizobium tropici* CIAT899, які за умов інокуляції ними *P. vulgaris* виявилися дефектними за нодуляційною конкурентоздатністю й азотфіксуючою активністю (Vinueza et al., 2003). Таким чином було ідентифіковано оперон, пов'язаний зі стрес-толерантністю і нодуляційною конкурентією.

Із батьківського штаму *R. tropici* CIAT899, що характеризувався високою стресостійкістю і формував ефективний симбіоз із рослинами *P. vulgaris* за умов підвищеної кислотності ґрунту, отримано Tn5-мутант PV9. При проведенні генетичного аналізу цього мутанта виявлено локус, який містить ген, що бе-

ре участь у модифікації мембранних ліпідів і відповідає за кислотостійкість та ефективність симбіозу (Rojas-Jiménez et al., 2005).

В Інституті фізіології рослин і генетики НАН України в результаті проведення транспозонового мутагенезу високоактивного штаму *S. meliloti* 425a одержано понад 3000 Tn5-мутантів, стійких до неоміцину і налідиксової кислоти. Серед них у 500 мутантів здійснено первинний скринінг за ознаками вірулентності, азотфіксуючої активності та ефективності. У результаті було відібрано понад 20 мутантів, які за своїми симбіотичними властивостями суттєво відрізнялися від батьківського штаму *S. meliloti* 425a. Встановлено, що різні сорти люцерни виявляли неоднакову реакцію на інфікування отриманими транспозоновими мутантами (Нічик та ін., 2000).

Tn5-мутанти *S. meliloti*, відмінні за симбіотичними властивостями, використовували як модельний об'єкт при вивченні взаємозв'язку інтенсивності азотфіксації і CO₂-газообміну та продуктивності рослин люцерни (Киризий і др., 2007). З'ясовано, що у фазі цвітіння зв'язок між інтенсивністю азотфіксації і фотосинтезом цілих рослин люцерни описувався логарифмічною кривою. У цей же період встановлено тісну залежність між інтенсивністю азотфіксації і масою цілої рослини, яка мала тенденцію до накопичення за високих значень інтенсивності азотфіксації. Збільшення нітрогеназної активності бульбочок супроводжувалося підвищенням інтенсивності дихання, причому зв'язок між цими показниками був виражений чіткіше, ніж між азотфіксуючою активністю і масою коренів рослин. Отже, для максимальної реалізації потенціалу вискоелективних штамів бульбочкових бактерій необхідні комплементарні їм генотипи рослин із фотосинтетичним апаратом інтенсивного типу, який здатний до збалансованого забезпечення асимілятами як симбіотичного апарату, так і ростових процесів самого макросимбіонта.

Шариповою зі співавт. (Sharipova et al., 1994) при використанні Tn5-мутагенезу отримана серія мутантів *S. meliloti*, які формували на 20 – 30 % ефективніший симбіоз, ніж вихідні штами СХМ1-105 і СХМ1-188.

У подальших дослідженнях було виявлено три нових гени, які, можливо, беруть участь у контролі симбіотичної ефективності бульбочкових бактерій люцерни. Мутації в цих генах спричиняють у бактерій плейотропний ефект і стосуються не лише ефективності, а й деяких

культурально-біохімічних ознак, що можуть бути використані як маркери eff-генів у генетичному аналізі симбіотичної ефективності. Отримані результати істотно розширюють знання про систему негативного контролю симбіотичної ефективності з боку бульбочкових бактерій (Онищук и др., 2008).

Нині переважна більшість робіт із Tn5-мутагенезу бульбочкових бактерій виконана з використанням швидкорослих ризобій, зокрема, *S. meliloti*. Що стосується транспозонового мутагенезу повільнорослих бульбочкових бактерій, а саме ризобій сої та люпину, то нам відомо небагато робіт даного напрямку. Так, за допомогою Tn5-мутагенезу отримані екзополісахаридні мутанти *B. japonicum* зі зниженою швидкістю утворення бульбочок і зменшеною конкурентоздатністю (Parniske et al., 1993).

Показано, що Tn5-мутанти штаму *B. japonicum* Is-1, утворені з використанням як донора *E. coli* S17-1, що містить плазмиду pUTKm, формували на коренях ефективні бульбочки на несумісній із батьківським штамом сої сорту CNS (*Rj₂Rj₃*). Зроблено припущення про зміни структури клітинної поверхні у Tn5-мутантів, що обмежує утворення бульбочок у рослин сої типу Rj₂ (Tsurumaru et al., 2008a). Автори розробили стратегію виділення плазмиди з Tn5-мутантів, отриманих із *B. japonicum* Is-1. Для цього вони запропонували рестрикційну карту штаму Is-1, побудовану з урахуванням цілісної геномної послідовності штаму USDA110 (Kaneko et al., 2002, Tsurumaru et al., 2008b).

Методом транспозонового мутагенезу отримано два мутанти *B. japonicum*, що виявляли властивості як стійкості до фагів, так і здатності до бульбочкоутворення. У природних умовах інокуляція такими мутантами може зменшувати інфікування рослин фагостійкими неефективними або малоефективними гомологічними ризобіям штамми (Arrunu et al., 2008).

Нами за допомогою плазмиди pSUP2021::Tn5 отримано колекцію транспозонових мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій сої і люпину, здійснено їх первинний скринінг за ознаками „азотфіксація” й „ефективність симбіозу” та встановлено гетерогенність за симбіотичними властивостями. Встановлено, що не всі штами *B. japonicum* і *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) можуть бути реципієнтами плазмиди pSUP2021::Tn5, оскільки частота транспозиції у деяких із них досить низька. Показано, що

ТРАНСПОЗОНИЙ МУТАГЕНЕЗ

соє і люпин, інокульовані новими Tn5-мутантами, утворюють симбіотичні системи, в яких інтенсифікація чи гальмування окремих фізіолого-біохімічних процесів пов'язані з формуванням симбіозу різної ефективності (Василюк та ін., 2007б; Маліченко та ін., 2006; 2007).

З'ясовано, що у рослин сої, інокульованої транспозонними мутантами, активність пероксидази у листках, коренях та бульбочках залежить від ефективності симбіозу. Показано, що у бульбочках сої, бактеризованої Tn5-мутантами *B. japonicum* 646, існує позитивний зв'язок між активністю каталази й азотфіксуючою активністю кореневих бульбочок (Василюк та ін., 2007а; Кругова и др., 2008).

При виготовленні і випробуванні бактеріальних добрив на основі нових штамів, особливо отриманих генно-інженерними методами, важливим є легкість і доступність ідентифікації таких штамів у ґрунті чи в бульбочках бобових рослин. Методом транспозонового мутагенезу з використанням плазмиди EDS 15, що містить Tn5, у штамів *Bradyrhizobium sp.* M29 і GN7, які інокують вигну (*Vigna radiata*), отримано мутанти, які можна ідентифікувати флуоресцентним методом завдяки наявності у них *gfp*-генів (Bhatia et al., 2002).

У різних за ефективністю симбіотичних системах сої, створених за участю нових транспозонних мутантів повільнорослих бульбочкових бактерій, нами виявлено два типи динаміки азотфіксуючої активності та інтенсивності фотосинтезу (Василюк та ін., 2008). Перший тип характеризується максимальною активністю вказаних процесів у фазі бутонізації, а другому притаманна найвища інтенсивність їх у фазі цвітіння. Належність симбіотичних систем, утворених за участю штамів і Tn5-мутантів, до першого чи другого типу динаміки асиміляційної активності не впливала на продуктивність рослин.

Нами встановлено, що інокуляція рослин сої і люпину активними Tn5-мутантами *B. japonicum* і *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) підвищує ефективність функціонування симбіотичних систем і призводить до збільшення їх продуктивності відповідно на 15–23 % і 10 % (Василюк та ін., 2007в). Показано, що застосування бактеріальних препаратів на основі транспозонних мутантів *B. japonicum*, модифікованих гомологічним лектином, додатково підвищувало азотфіксуючу активність симбіотичної системи соє – *B. japonicum* та зернову продуктивність рослин (Сытников и др., 2008).

Отже, одержання транспозонних мутантів ризобій і вивчення їх властивостей, зокрема симбіотичних, має велике значення для розуміння процесів та встановлення механізмів, які лежать в основі формування бобово-ризобіального симбіозу. З іншого боку, використання транспозонних мутантів бульбочкових бактерій із покращеними симбіотичними властивостями для створення ефективних азотфіксуючих систем сприятиме підвищенню врожайності вирощуваних бобових культур.

Комплексне поєднання генно-інженерних методів з фізіолого-біохімічними дослідженнями бобово-ризобіального симбіозу дозволить створити висококомплементарні пари «сорт бобової рослини – штам бульбочкових бактерій», в результаті чого відкривається можливість максимальної реалізації генетичного потенціалу вирощуваних культур.

ЛІТЕРАТУРА

- Антипчук А.Ф. Экологические аспекты селекции ризобий и повышение эффективности симбиоза // Физиология и биохимия культ. растений. – 1994. – Т. 26, № 4. – С. 315–333.
- Антипчук А.Ф., Рангелова В.Н., Скочинская Н.Н. и др. Использование различных показателей при оценке эффективности клубеньковых бактерий // Микробиол. журн. – 1985. – Т. 47, № 4. – С. 89–90.
- Аронштам А.А., Умаров Б.Р., Ерко В.М. и др. Использование космидного банка генов *Rhizobium meliloti* для клонирования гена биосинтеза лейцина, участвующего в контроле развития азотфиксирующего симбиоза с люцерной // Генетика. – 1993. – Т. 29, № 2. – С. 235–245.
- Василюк В.М., Кірізій Д.А., Коць С.Я. Динаміка фотосинтетичної й азотфіксуючої активностей та продуктивності сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Доп. НАН України. – 2008. – № 1. – С. 147–152.
- Василюк В.М., Кругова О.Д., Мандровська Н.М., Коць С.Я. Активність пероксидази і каталази у сої, інокульованої Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007а. – Т. 39, № 4. – С. 334–342.
- Василюк В.М., Мельникова Н.М., Михалків Л.М. та ін. Формування симбіотичних взаємовідносин рослин люпину з транспозонними мутантами *Bradyrhizobium sp.* (*Lupinus*) // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007б. – Т. 39, № 3. – С. 233–241.
- Василюк В.М., Якимчук Р.А., Коць С.Я. Ефективність симбіозу сої і люпину з Tn5-мутантами

- Bradyrhizobium* в умовах Черкаської області // Сучасний стан і пріоритети розвитку фізіології рослин, генетики і біотехнології: Тези доп. X конф. мол. вчених (Київ, 25–26 жовтня 2007 р.). – К., 2007в. – С. 87.
- Воробей Н.А., Маличенко С.М., Береговенко С.К. Физиологические особенности развития сои в симбиозе с транспозантами *Bradyrhizobium japonicum* // Тез. докл. III Междунар. конф. «Биология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – М., 2004. – С. 29–31.
- Воробей Н.А. Симбиотичні властивості та стабільність плазмідних маркерів у музейних транскон'югантів *Sinorhizobium meliloti* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 4. – С. 341–348.
- Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. – Л.: Наука, 1970. – 191 с.
- Єрко В.М. Короткий огляд генетичних методів вивчення бульбочкових бактерій // Физиология и биохимия культ. растений. – 1998. – Т. 30, № 1. – С. 3–13.
- Зарецкая А.Н. Метод трансформации как способ повышения активности клубеньковых бактерий люцерны // Микробиология. – 1976. – Т. 45, вып. 5. – С. 873–876.
- Затовская Т.В., Ушаков К.В., Юргель С.Н. и др. Получение Tn5-мутантов *Rhizobium meliloti* с измененным составом липополисахаридов и анализ их симбиотических свойств // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 6. – С. 742–748.
- Затовская Т.В., Шарыпова Л.А., Селиверстова Е.В., Симаров Б.В. Мутант Tr63 по гену tolC штамма СХМ1-188 *Sinorhizobium meliloti* не способен к формированию эффективного симбиоза с люцерной // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 323–332.
- Злотников К.М., Чатуев Б.В., Ивашина Т.В., Хмельницкий М.И. Выделение ауксотрофных мутантов у *Rhizobium japonicum* и *Rhizobium phaseoli* // Генетика. – 1983. – Т. 19, № 9. – С. 1404–1408.
- Кириций Д.А., Воробей Н.А., Коць С.Я. Взаимосвязь азотфиксации и фотосинтеза как основных составляющих продукционного процесса у люцерны // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 5. – С. 666–671.
- Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. – Киев: Наукова думка, 2007. – 315 с.
- Кругова Е.Д., Коць С.Я., Мандровская Н.М., Василюк В.М. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в клубеньках и корнях сои, инокулированной Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1 (13). – С. 6–14.
- Курчак О. Н., Проворов Н.А., Симаров Б.В. Плазмида pSym 1-32 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, контролирующая азотфиксирующую активность, эффективность симбиоза, конкурентоспособность и кислотоустойчивость // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1225–1232.
- Маличенко С.М., Воробей Н.А., Даценко В.К., Коць С.Я. Одержання та первинний скринінг за симбіотичними властивостями транспозантів бульбочкових бактерій сої // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин: Мат-ли Всеукр. наук.-практ. конф. до 90-річчя проф. О.Ф. Михайлова. – Дніпропетровськ: ДНУ, 2005. – С. 32–33.
- Маличенко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М. Эффективность симбиотических систем, utworених за участю сої і транспозантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 646 // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. – 2006. – Вип. 18. – С. 144–148.
- Маличенко С.М., Даценко В.К., Василюк В.М., Коць С.Я. Транспозононий мутагенез штамів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 409–418.
- Нічик М.М., Пазюк О.А., Бобер А.Ф., Баушкірова Н.В. Ефективність симбіозу люцерни з новими штамми бульбочкових бактерій, отриманих методом транспозононого мутагенезу // Физиология и биохимия культ. растений – 2000. – Т. 32, № 3. – С. 219–222.
- Ничик М.М., Яковец Л.М., Воробей Н.А. и др. Симбиотические свойства клубеньковых бактерий люцерны, полученных методом межродовой конъюгации // Физиология и биохимия культ. растений. – 1992. – Т. 24, № 1. – С. 41–47.
- Онищук О.П., Курчак О.Н., Шарыпова Л.А. и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 11. – С. 1507–1512.
- Онищук О.П., Чижевская Е.П., Курчак О.Н., Симаров Б.В. Выявление новых генов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*), вовлеченных в контроль эффективности симбиоза с *Medicago sativa* // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Мат-лы Междунар. науч. конф. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. — С. 258–260.
- Онищук О.П., Шарыпова Л.А., Курчак О.Н. и др. Выявление генов *Sinorhizobium meliloti*, влияющих на синтез поверхностных полисахаридов и конкурентоспособность // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 12. – С. 1617–1623.

ТРАНСПОЗОНИЙ МУТАГЕНЕЗ

- Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот. – К.: Світ, 2003. – 424 с.
- Прозоров А.А. Горизонтальный перенос генов у бактерий: лабораторное моделирование, природные популяции, данные геномики // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 5. – С. 632–646.
- Румянцева Т.Б., Юргель С.Н., Шарыпова Л.А. и др. Ген Sma1514 вовлечен в формирование эффективного симбиоза *Sinorhizobium meliloti* с люцерной // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Мат-лы Междунар. науч. конф. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. — С. 258–260.
- Сафронова В.И., Новикова Н.И. Организация конъюгативных плазмид у штаммов СИАМ0701 и СИАМ0710 *Rhizobium galegae* при введении вектора-“самоубийцы” pSUP21111 // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 6. – С. 763–768.
- Симаров Б.В., Аронштам А.А., Новикова Н.И. и др. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий. – Л.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
- Сытник Д.М., Воробей Н.А., Береговенко С.К. Эффективность биопрепаратов на основе Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum*, модифицированных гомологичным лектином // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 3 (15). – С. 46–52.
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. – СПб.: Наука, 1998. – 194 с.
- Тихонович И.А., Проворов Н.А. Принципы селекции растений на взаимодействие с симбиотическими микроорганизмами // Вестн. ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 3. – С. 295–305.
- Фізіолого-біохімічні особливості живлення рослин біологічним азотом / С.Я. Коць, С.М. Маліченко, О.Д. Кругова та ін. – К.: Логос, 2001. – 271 с.
- Федоров С.Н., Зарецкая А.Н. Индуцирование этилметансульфатом ауксотрофных мутантов *Rhizobium meliloti* и их характеристика // Микробиология. – 1978. – Т. 47, № 4. – С. 728–732.
- Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов *Rhizobium meliloti* с измененными симбиотическими свойствами под действием УФ-излучения // С.-х. биология. – 1987. – № 9. – С. 44–49.
- Чернова Т.А., Аронштам А.А., Симаров Б.В. Изучение генетической природы неvirulentных мутантов СХМ1–125 и СХМ1–126 *Rhizobium meliloti* // Генетика. – 1986. – Т. 22, № 8. – С. 2066–2073.
- Чижевская Е.П., Крель Е.А., Онищук О.П. и др. Физическое и генетическое картирование мутаций симбиотической эффективности на мегаплазмиде-2 штамма СХМ1 *Rhizobium meliloti* // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 9. – С. 1220–1227.
- Шапошников Г.Л., Евстигнеева З.Г., Асеева К.Б., Кретович В.Л. Изменение интенсивности фиксации молекулярного азота, содержание свободных аминокислот, аммиака в клубеньках люпина в течение суток // Физиология растений. – 1975. – Т. 55. – С. 85–91.
- Юргель С.Н., Шарыпова Л.А., Симаров Б.В. Tn5-мутации *Rhizobium meliloti*, вызывающие повышение редокс-потенциала свободноживущих клеток и эффективность их симбиоза с люцерной // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 6. – С. 737–741.
- Appunu C., Dhar B. Isolation and symbiotic characteristics of two Tn5-derived phage-resistant *Bradyrhizobium japonicum* strains that nodulate soybean // Curr Microbiol. – 2008. – V. 57. – P. 212–217.
- Balassa G. Genetic transformation of *Rhizobium* // Bact. Rev. – 1963. – V. 27, № 2. – P. 228–241.
- Bellato C., Krishnan H.B., Cubo T. et al. The soybean cultivar specificity gene nolX is present, expressed in nodD-dependent manner, and of a symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of *Rhizobium (Sinorhizobium) fredii* // Microbiology. – 1997. – V. 4, N 143. – P. 1381–1388.
- Beringer J.E., Beynon J.L., Buchanan-Wollaston A.V., Johnston A.W.B. Transfer of drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium* // Nature. – 1978. – V. 276. – P. 633–634.
- Bhatia R., Dogra R.C., Sharma P.K. Construction of green fluorescent protein (GFP)-marked strains of *Bradyrhizobium* for ecological studies // J. Appl. Microbiol. – 2002. – V. 93. – P. 835–839.
- Breedveld M.W., Hadley J.A., Miller R.J. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti* // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177, N 22. – P. 6346–6351.
- Castro-Sowinski S., Martinez-Drets G., Okon Y. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti* // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – V. 209. – P. 119–125.
- Castro-Sowinski S., Matan O., Bonafede P., Okon Y. A thioredoxin of *Sinorhizobium meliloti* CE52G is required for melanin production and symbiotic nitrogen fixation // Mol. Plant Microbe Interact. – 2007. – V. 20, N 8. – P. 986–993.
- Charles T.C., Doty S.L., Nester E.W. Construction of *Agrobacterium* strains by electroporation of genomic DNA and its utility in analysis of chromosomal virulence mutations // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60, N 11. – P. 4192–4194.

- Chen H., Richardson A.E., Rolfe B.G. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 6. – P. 1798–1804.
- Comfort N.C. From controlling elements to transposons: Barbara McClintock and the Nobel Prize // Trends Biochem. Sci. – 2001. – V. 26. – P. 454–457.
- Depicker A. A broad host range plasmid vector systems for gram-negative bacteria // Genus. – 1980. – V. 10, N 4. – P. 329 – 338.
- Dorgai L., Papp L., Papp P. et al. Nucleotide sequences of the sites involved in the integration of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41 // Nucl. Acid. Res. – 1993. – V. 21, N 7. – P. 1671.
- Dymov S.I., Meek D.J.J., Steven B., Driscoll B.T. Insertion of transposon Tn5tac1 in the *Sinorhizobium meliloti* malate dehydrogenase (*mdh*) gene results in conditional polar effects on downstream TCA cycle genes // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2004. – V. 17, N 12. – P. 1318–1327.
- Ferraioli S., Taté R., Caputo E. et al. The *Rhizobium etli* argC gene is essential for arginine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2001. – V. 14, N 2. – P. 250–254.
- Goryshin I.Y., Jendrisak J.J., Hoffman L.M. et al. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes // Nat. Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 97–100.
- Goryshin I.Y., Reznikoff W.S. Tn5 *in vitro* transposition // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 7367–7374.
- Guilhabert M.R., Hoffman L.M., Mills D.A., Kirkpatrick B.C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes // Mol. Plant Microbe. Interact. – 2001. – V. 14. – P. 701–706.
- Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics // Annu. Rev. Genet. – 2003. – V. 37. – P. 3–29.
- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S. et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 // DNA Res. – 2002. – V. 9. – P. 189–197.
- Karr D.B., Rong-Ti Liang, Reuhs B.L., Emerich D.W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation // Planta. – 2000. – V. 211. – P. 218–226.
- Ko Y.H., Randall G. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium fredii* USDA191 // J. Gen. Microbiol. – 1990. – V. 136. – N 1. – P. 105–113.
- Kwon Y.M., Ricke S.C. Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences // J. Microbiol. Methods. – 2000. – V. 41. – P. 195–199.
- Lagares A., Niehaus K., Lorenzen J. et al. Genetic characterization of a *Rhizobium meliloti* chromosomal DNA region involved in lipopolysaccharide biosynthesis and symbiosis // Abstract of 10th Intern. Congress on Nitrogen Fixation (Russia, 28 May – 3 June). – St.-Petersburg, 1995. – N 190. – P. 331.
- Lerouge I., Laeremans T., Verreth C. et al. Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, N 20. – P. 17190–17198.
- Marroqui S., Zorrequieta A., Santamaria C. et al. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183, N 3. – P. 854–864.
- Modern Microbial Genetics / Ed. by N.U. Streips, R.E. Yasbin. – N.-Y.: Wiley-Liss, 2002. – 603 p.
- Noel K.D.R., Forsberge L.E., Carlson R.W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182, N 19. – P. 5317–5324.
- Parniske M., Kosch K., Werner D., Muller P. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max* // Mol. Plant-Microbe. Interact. – 1993. – V. 6, N 1. – P. 99–106.
- 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. – V. 72, № 6. – P. 4329–4337.
- Reznikoff W.S. The Tn5 transposon // Annu. Rev. Microbiol. – 1993. – V. 47. – P. 945–963.
- Reznikoff W.S. Tn5 as a model for understanding DNA transposition // Mol. Microbiol. – 2003. – V. 47. – P. 1199–1206.
- Rojas-Jiménez K., Sohlenkamp C., Geiger O. et al. A ClC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance // Mol. Plant Microbe. Interact. – 2005. – V. 18, N 11. – P. 1175–1185.
- Scotti M.R., Carvalho-Silva D.R., Vargas M.A.T. et al. Changes in electroforetic of lipopolysaccharides from competitive strains of *Bradyrhizobium* spp. induced by soybean roots // J. Appl. Microbiol. – 1997. – V. 83. – P. 552–560.

ТРАНСПОЗОНОВИЙ МУТАГЕНЕЗ

- Sharypova L.A., Onischchuk O.P., Chesnokova O.N. et al. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness // *Microbiology*. – 1994. – V. 140. – P. 463–470.
- Simon R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria // *Methods Enzymol.* – 1986. – V. 118. – P. 640–659.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // *Biotechnol.* – 1983. – V. 1, N 11. – P. 784–791.
- Soto M.J., Sanjuan J., Olivares J. The disruption of a gene encoding a putative arylesterase impairs pyruvate dehydrogenase complex activity and nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2001. – V. 14, N 6. – P. 811–815.
- Tatè R., Ferraioli S., Filosa S. et al. Glutamine utilization by *Rhizobium etli* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2004. – V. 17, N 7. – P. 720–728.
- Tatè R., Riccio A., Caputo E. et al. The *Rhizobium etli* metZ gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1999. – V. 12, N 1. – P. 24–34.
- Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. The efficient strategy of plasmid rescue from Tn5 mutants derived from *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, based on whole genome sequence information of strain USDA110 // *J. Bac. Agr., Kyushu Univ.* – 2008. – V. 53, N 1. – P. 27–31.
- Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. Tn5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 with altered compatibility with *Rj2*-soybean cultivars // *Soil Science and Plant Nutrition.* – 2008. – V. 54. – P. 197–203.
- Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондорши, П. Хукаса. – СПб.: 2002. – 563 с.
- Vinuesa P., Neumann-Silkow F., Pacios-Bras C. et al. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2003. – V. 16, N. 2 – P. 159–168.
- Voelker L.L., Dybvig K. Transposon mutagenesis // *Methods Mol. Biol.* – 1998. – V. 104. – P. 235–238.

Надійшла до редакції
22.01.2009 р.

TRANSPOSON MUTAGENESIS AS THE EFFECTIVE MEAN TO OBTAIN THE NEW STRAINS OF NODULE BACTERIA

S. Ya. Kots, V. M. Melnyk, V. K. Datsenko

*Institute of Plant Physiology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The paper provides general characteristics of genetic and biotechnological approaches used in rhizobia selection. Advantages of transposon mutagenesis over the others methods used in selection the new strains of nodule bacteria are shown on the basis of the literary information and own research data analysis.

Key words: *transposon mutagenesis, Tn5-mutants, nodule bacteria, legume-rhizobial symbiosis*

КОЦЬ, МЕЛЬНИК, ДАЦЕНКО

**ТРАНСПОЗОНОВЫЙ МУТАГЕНЕЗ
КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ**

С. Я. Коць, В. Н. Мельник, В. К. Даценко

*Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Представлена общая характеристика генетических и биотехнологических подходов, используемых при селекции ризобий. На основании анализа литературных данных и собственных исследований показано преимущество транспозонного мутагенеза по сравнению с другими методами при селекции новых штаммов клубеньковых бактерий, его значение и перспективы использования в работе с клубеньковыми бактериями.

Ключевые слова: *транспозонный мутагенез, Tn5-мутанты, клубеньковые бактерии, бобово-ризобийный симбиоз*