



УДК 576.851.155:633.31

## КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА *RHIZOBIUM MELILOTI*, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ У ЛЮЦЕРНЫ

В. В. Кучко, Б. В. Симаров

**Введение.** Процесс формирования азотфиксирующих клубеньков бобовыми растениями при взаимодействии их с бактериями рода *Rhizobium* состоит из большого числа этапов, контролируемых генами обоих симбионтов [1]. В настоящее время с использованием методов генной инженерии установлена структурная организация некоторых генов бактерий, ответственных за такие важные симбиотические свойства, как специфичность по отношению к растению-хозяину, способность образовывать клубеньки, синтез нитрогеназного комплекса и др. [2, 3]. Вместе с тем исследована только небольшая часть симбиотических генов (sum-генов) у ограниченного числа штаммов клубеньковых бактерий, вследствие чего генетический контроль целого ряда этапов становления эффективного симбиоза остается малоизученным. В связи с этим представляется целесообразным для дальнейшего изучения молекулярных механизмов взаимодействия клубеньковых бактерий с бобовыми растениями использовать новые штаммы этих микроорганизмов, а также их мутанты с измененными симбиотическими признаками.

В данной работе проведено клонирование генетического материала эффективного штамма СХМ1 клубеньковых бактерий люцерны и оценены симбиотические свойства гибридов, полученных при введении рекомбинантных плазмид в авирулентные мутанты СХМ1-125 и СХМ1-126, имеющие нарушения в различных под-генах [4].

**Материалы и методы.** Список штаммов и плазмид, использованных в работе, представлен в табл. 1. Клубеньковые бактерии выращивали на среде 79 [5], дополненной казаминовыми кислотами («Serva», ФРГ) до конечной концентрации 2 г/л. Для *E. coli* применяли среду LB. Селективные среды готовили, добавляя антибиотики («Serva», ФРГ) в следующих концентрациях: тетрациклин (tc) — 10 мкг/мл, стрептомицин (str) — 500 мкг/мл, налидиксовая кислота (nal) — 30 мкг/мл, рифампицин (rif) — 30 мкг/мл. Трехродительское скрещивание вели с участием штамма *E. coli* HB101, несущего плазмиду-помощник *pRK2013*, на твердой среде LB [6]. Тотальную ДНК штамма СХМ1 выделяли по методу Кондороши [7], плазмидную — Бирнбойма — Доли [8]. Для рестрикции использовали фермент *EcoRI*, а для лигирования — ДНК-лигазу фага T4 (ВНИИ прикл. энзимологии, Вильнюс). Препараты плазмидной и тотальной ДНК анализировали с помощью электрофореза в 0,7 %-ной агарозе, в трис-боратном буфере. Трансформацию клеток *E. coli* проводили по схеме Брауна [9]. Симбиотические свойства трансконъюгантов оценивали в микровегетационных опытах [10] при инокуляции люцерны сорта Зайкевича.

**Результаты и обсуждение.** Для клонирования генетического материала штамма СХМ1 использована плаزمида *pRK290*, способная реплицироваться и поддерживаться в большинстве видов грам-отрицатель-

ных микроорганизмов и имеющая уникальные сайты для рестрикции ферментами *EcoRI* и *BglII*. Встройку фрагментов тотальной ДНК СХМ1, полученных в условиях неполной рестрикции, проводили по *EcoRI*-сайту. В результате трансформации клеток *E. coli* HB101 лигационной смесью было отобрано около 10000 клонов, устойчивых к тетрациклину. Для выявления доли трансформантов, несущих гибридные плазмиды, проведен скрининг 40 клонов, в 15 из которых были обнаружены рекомбинантные плазмиды, содержащие генетический материал штамма СХМ1 в виде фрагментов ДНК размерами от 4000 до

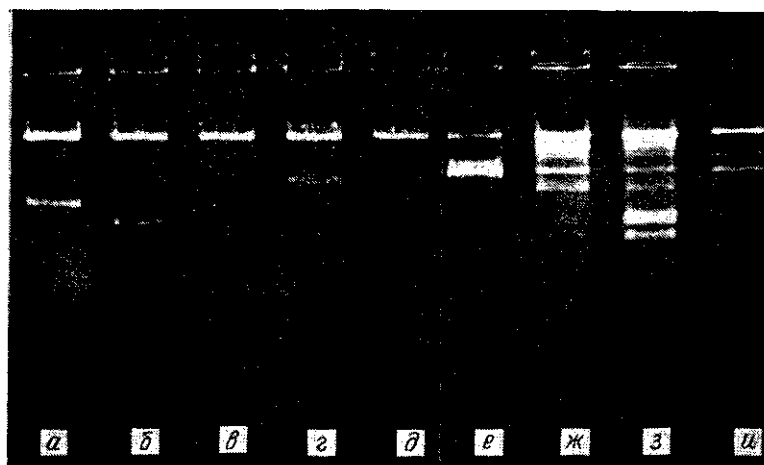


Рис. 1. Электрофореграмма *EcoRI*-рестрикт ДНК рекомбинантных плазмид, выделенных из трансформантов штамма *E. coli* HB101 (а — з), и ДНК фара  $\lambda$

Fig. 1. The picture of electrophoretic separation of *EcoRI* cleavage products of recombinant plasmids DNA isolated from HB101 transformants (а — з); lane (и) is a set of size standards derived from a *EcoRI* digest of bacteriophage  $\lambda$  DNA

Таблица 1

Штаммы и плазмиды, использованные в работе  
The strains and plasmids used

Штаммы и плазмиды	Маркеры	Источник
<i>R. meliloti</i>		
СХМ1	str <sup>r</sup>	[10]
СХМ1-125	nod <sup>-</sup> , str <sup>r</sup> , rif <sup>r</sup> , nov <sup>r</sup>	[4]
СХМ1-126	nod <sup>-</sup> , str <sup>r</sup> , rif <sup>r</sup> , nov <sup>r</sup>	
<i>E. coli</i>		
HB101	lac <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> , r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> , end1 <sup>-</sup>	[12]
pRK290	rep RK2, tc <sup>r</sup> , IncP-1	[6]
pRK2013	rep colE1, nm <sup>r</sup>	[13]

30000 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1). Таким образом, можно предположить, что из 10000 трансформантов около 3000 содержат клонированную ДНК штамма СХМ1. При скрещивании трансформантов *E. coli*, содержащих в составе гибридных плазмид фрагменты генома *R. meliloti*, с авирулентными мутантами штамма СХМ1 могли образовываться трансконъюганты, восстановившие способность формировать клубеньки у проростков люцерны за счет клонированного генетического материала штамма СХМ1. Известно, что растения люцерны способны образовывать клубеньки даже при наличии в инокулюме около 10 вирулентных

клеток на  $10^8$  авирулентных, вследствие чего в условиях стерильного микровегетационного опыта возможен отбор единичных вирулентных трансконъюгантов [11]. Поэтому для идентификации гибридных плазмид, несущих гены вирулентности, все полученные трансформанты были разбиты на 20 групп по 500 клонов. Затем были проведены скрещивания каждой группы, имеющей по нашим расчетам около 150 клонов с гибридными плазмидами, с авирулентными мутантами СХМ1-125 и СХМ1-126, полученными под действием УФ-света в нашей лаборатории [4]. Мутанты не дают реверсий к вирулентности и несут мегаплазмиды, не отличающиеся по электрофоретической подвижности от мегаплазмид исходного штамма [14]. По-видимому, потеря способности образовывать клубеньки у обоих штаммов связана с небольшими делециями симбиотической мегаплазмиды, что исключает ревертирование к вирулентности и не влияет на электрофоретическую подвижность кольцевых молекул ДНК с молекулярной массой, превышающей  $400 \cdot 10^6$ . В результате скрещиваний 20 групп трансформантов с авирулентными мутантами СХМ1-125 и СХМ1-126 с частотой  $10^{-2}$ — $10^{-3}$  образовались трансконъюганты, которые были использованы для инокуляции проростков люцерны. Результаты микровегетационного опыта показали, что среди трансконъюгантов, образовавшихся в семи вариантах скрещиваний, имеются бактерии, восстановившие способность индуцировать формирование клубеньков у люцерны. После выделения из клубеньков, клонирования и проверки на селективных средах отдельные клоны трансконъюгантов каждого варианта скрещивания были вновь использованы для инокуляции проростков люцерны. Результаты проверки симбиотических свойств трансконъюгантов представлены в табл. 2. Можно

Таблица 2

Типы трансконъюгантов *R. meliloti*, образующихся при скрещивании разных групп трансформантов *E. coli* с авирулентными мутантами СХМ1-125 и СХМ1-126

The types of *R. meliloti* transconjugants obtained from mating of different groups of *E. coli* transformants with avirulent mutants СХМ1-125 and СХМ1-126

Штаммы-реципиенты	Доноры (группы трансформантов <i>E. coli</i> , несущих гибридные плазмиды)			
	6	7	13	20
СХМ1-125	—	III	I, II, III	I, II
СХМ1-126	I	I, II	I, II, III	I, II

Примечание. I — трансконъюганты, образующие клубеньки, но не фиксирующие азот ( $Nod^+$ ,  $Fix^-$ ); II — трансконъюганты с низким уровнем азотфиксирующей активности, не вызывающие увеличения массы инокулированных ими растений ( $Nod^+$ ,  $Fix^+$ ,  $Eff^-$ ); III — трансконъюганты, восстановившие симбиотические свойства до уровня исходного эффективного штамма СХМ1 ( $Eff^+$ ).

видеть, что по степени восстановления симбиотических свойств трансконъюганты могут быть разделены на три класса. В проведенных ранее экспериментах [15] было показано, что перенос факторов вирулентности в мутанты СХМ1-125 и СХМ1-126 при помощи плазмиды *R68.45* может сопровождаться появлением трансконъюгантов с различной эффективностью. Кроме того, имеются данные о том, что у мутанта СХМ1-125 нарушены гены, контролирующие ранние стадии образования клубеньков, а у мутанта СХМ1-126 — еще и гены, контролирующие следующие, более специфические стадии [4]. В связи с этим наши результаты могут свидетельствовать о том, что: 1) у обоих мутантов, по-видимому, повреждены гены, контролирующие активность нитрогеназы и эффективность азотфиксации; 2) эти гены могут находиться на одном клони-

рованном фрагменте ДНК совместно с генами, контролирующими как ранние, так и последующие стадии образования клубеньков. Можно предположить, что появление трех классов трансконъюгантов определяется различиями в клонированном генетическом материале штамма СХМ1, который был введен авирулентным мутантам. Мы провели проверку 120 вирулентных трансконъюгантов на наличие у них гибридных плазмид. У большинства трансконъюгантов были идентифицированы векторные плазмиды, не содержащие фрагментов ДНК штамма СХМ1. У некоторых из них в процессе хранения на неселективных средах происходила элиминация плазмиды *pRK290*, при этом симбиотические свойства этих штаммов не изменялись. Несколько эффективных трансконъюгантов, полученных в скрещивании СХМ1-125 (7) (табл. 2), содержали идентичные друг другу гибридные плазмиды, несущие клонированный фрагмент тотальной ДНК штамма СХМ1 размером около 80000 п. н. (рис. 2). По-видимому, практически все проанализированные трансконъюганты являются гаплоидными рекомбинантами, у которых восстановление вирулентности связано с интеграцией клонированных генов в мегаплазмиду или хромосому, после чего векторная плазида не несет ризобияльных генов. Известно, что при внутривидовых скрещиваниях клубеньковых бактерий с использованием *R*-плазмид, как правило, воз-

Рис. 2. Электрофореграмма *EcoRI*-рестриктов ДНК гибридных плазмид, выделенных из эффективных трансконъюгантов (а, б), и ДНК фага  $\lambda$  (в)

Fig. 2. Electrophoregram of *EcoRI* digest DNA of recombinant plasmids isolated from effective transconjugants *R. meliloti* (а, б); DNA size standards derived from a *EcoRI* digest of bacteriophage  $\lambda$  (в)



никают гаплоидные рекомбинанты [16]. Кроме того, установлено, что стабильность *R'* в таких скрещиваниях может зависеть от величины и природы клонированного фрагмента [17]. Не исключено также, что отбор гаплоидных трансконъюгантов связан с неспособностью некоторых *sum*-генов нормально функционировать в составе векторной плазмиды *pRK290*, из-за чего в формировании клубеньков принимают участие преимущественно интегративные формы. В пользу последнего предположения может свидетельствовать факт задержки образования клубеньков первичными вирулентными трансконъюгантами по сравнению с исходным штаммом СХМ1. Стабильность рекомбинантной плазмиды в некоторых эффективных трансконъюгантах, возможно, связана с возникновением спонтанной мутации в одной из клеток реципиентного штамма СХМ1-125, которая привела к нарушениям в системе рекомбинации.

Таким образом, нами получена коллекция клонов *E. coli*, содержащих фрагменты тотальной ДНК эффективного штамма СХМ1 клубеньковых бактерий люцерны. При скрещивании клонов коллекции с авирулентными мутантами СХМ1-125 и СХМ1-126 в ряде случаев были обнаружены трансконъюганты, с разной степенью восстановившие симбиотические свойства, при этом большинство вирулентных штаммов оказалось гаплоидными рекомбинантами. У некоторых эффективных трансконъюгантов была идентифицирована гибридная плазида, содержащая ДНК штамма СХМ1 с суммарным размером *EcoRI*-фрагментов не менее 80000 п. н.

CLONING OF GENETIC MATERIAL OF RHIZOBIUM MELILOTI  
CONTROLLING THE PROCESS OF ALFALFA NODULATION

V. V. Kuchko, B. V. Simarov

All-Union Research Institute of Agricultural Microbiology, Leningrad

Summary

The total DNA of an effective *Rhizobium meliloti* strain CXM1 was cloned in *pRK290* plasmid in *E. coli*. Transconjugants with the different efficiency of symbiotic properties are obtained during mating of recombinant *E. coli* clones with avirulent *R. meliloti* mutants CXM1-125 and CXM1-126. A recombinant plasmid restoring effective symbiosis of CXM1-125 mutant with alfalfa is identified.

1. Vinsent J. M. Factor controlling the legume-Rhizobium symbiosis // Proc. steenbook kettering int. symp. nitrogen fixation / Eds W. E. Newton, W. H. Orme-Johnston.— Baltimore: Univ. Park press, 1980.— P. 103—129.
2. Corbin D., Barran L., Ditta G. Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1983.— 80, N 10.— P. 3005—3009.
3. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes / I. Torok, E. Kondorosi, T. Strepkowski et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1985.— 201, N 2.— P. 296—300.
4. Чернова Т. А. Перенос детерминант вирулентности *Rhizobium meliloti* при конъюгации и анализ симбиотических свойств трансконъюгантов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Л., 1985.— 18 с.
5. Allen O. N. Experiments in soil bacteriology.— Minneapolis: Burgess Publ. Co., 1959.— 234 p.
6. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* / G. Ditta, S. Stanfield, D. Corbin, D. R. Helinski // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.— 77, N 12.— P. 7347—7351.
7. Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other Rhizobia and *Agrobacterium* / A. Kondorosi, E. Kondorosi, C. E. Pankhurst et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1982.— 188, N 3.— P. 433—439.
8. Birnboim H. C., Doly J. A rapid extraction procedure for screening recombinant DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
9. Transformation of *Escherichia coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth / M. G. M. Brown, A. Weston, I. R. Saunders, G. O. Humphreys // FEMS Microbiol. Lett.— 1979.— 5, N 3.— P. 219—222.
10. Федоров С. Н., Бутвина О. Ю., Симаров Б. В. Мутагенное действие УФ-излучения на клубеньковые бактерии люцерны и анализ симбиотических свойств полученных ауксотрофных мутантов // Генетика.— 1983.— 19, № 5.— С. 727—736.
11. Лронштам А. А., Чернова Т. А., Симаров Б. В. Исследование молекулярно-генетических механизмов вирулентности клубеньковых бактерий. I. Восстановление симбиотических свойств у неvirulentных мутантов *Rhizobium meliloti* при конъюгации // Там же.— № 4.— С. 559—564.
12. Boyer H. M., Roullard-Dussoix D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.— 1969.— 41, N 3.— P. 459—472.
13. Figurski D., Helinski D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid *RK2* dependent on a plasmid function provided in trans // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— 76, N 4.— P. 1648—1652.
14. Федоров С. Н., Кучко В. В., Фокина И. Г. Симбиотические и культуральные свойства клубеньковых бактерий люцерны с измененным плазмидным составом // Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии.— 1985.— № 4.— С. 25—28.
15. Чернова Т. А. Использование конъюгации с помощью R-факторов в селекции клубеньковых бактерий люцерны // Молекуляр. механизмы генет. процессов: Тез. докл. V Всесоюз. симпоз.— М., 1983.— С. 123.
16. Beringer J. E., Johnston A. W. B. The genetic of the *Rhizobium*-legume symbiosis // Isotops biol. dinitrogen fixation.— Vienna: Proc. Vienna, 1978.— P. 27—39.
17. Isolation and characterization of an R-prime plasmid from *Rhizobium meliloti* / G. B. Kiss, K. Dobo, I. Dusha et al. // J. Bacteriol.— 1980.— 141, N 1.— P. 121—128.

ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград

Получено 18.03.86