

<https://doi.org/10.17816/ecogen17235-42>

ИСКУССТВЕННАЯ АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ *NIF*-ГЕНОВ У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *EX PLANTA*

© Ан.Х. Баймиев, Р.С. Гуменко, А.А. Владимирова, Е.С. Акимова, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа

Для цитирования: Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., и др. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 2. — С. 35–42. <https://doi.org/10.17816/ecogen17235-42>.

Поступила: 24.01.2019

Одобрена: 17.04.2019

Принята: 17.06.2019

Исследована возможность модификации регуляции азотфиксации у клубеньковых бактерий *Mesorhizobium*, *Ensifer* и *Rhizobium* путем привнесения в их геном дополнительной копии гена *nifA* под регуляцией бактериальных индуцируемых промоторов. Показано, что экспрессия *nifA* в рекомбинантных клетках всех трех родов бактерий приводит к появлению незначительной нитрогеназной активности. При этом уровень нитрогеназной активности не имеет явной корреляции с уровнем экспрессии привнесенного гена *nifA*, что, скорее всего, является следствием многоуровневости регуляции азотфиксации. Наиболее интересны результаты, полученные с рекомбинантным штаммом *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, который продемонстрировал нитрогеназную активность при свободноживущем состоянии, в несколько раз превышающую таковую у контрольного свободноживущего азотфиксирующего штамма *Pseudomonas* sp. K749. При этом штаммом была утрачена способность к клубенькообразованию, а также у рекомбинантных бактерий наряду с нитрогеназной выявлена нитраредуктазная активность.

Ключевые слова: азотфиксация; клубеньковые бактерии; *nifA*; рекомбинантные бактерии; плазмидный вектор; промотор.

ARTIFICIAL ACTIVATION OF *NIF* GENE EXPRESSION IN NODULE BACTERIA *EX PLANTA*

© Ан.К. Baymiev, R.S. Gumenko, A.A. Vladimirova, E.S. Akimova, Z.R. Vershinina, Al.K. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

For citation: Baymiev AnK, Gumenko RS, Vladimirova AA, et al. Artificial activation of *nif* gene expression in nodule bacteria *ex planta*. *Ecological genetics*. 2019;17(2):35-42. <https://doi.org/10.17816/ecogen17235-42>.

Received: 24.01.2019

Revised: 17.04.2019

Accepted: 17.06.2019

Background. Rhizobia are the most effective nitrogen-fixing organisms that can fix nitrogen only in symbiosis with leguminous plants. The general transcriptional activator of nitrogen fixation genes in diazotrophic bacteria is NifA. In this work, the possibility of modifying the regulation of nitrogen fixation in the nodule bacteria *Mesorhizobium*, *Ensifer* and *Rhizobium* was studied by introducing an additional copy of the *nifA* gene into the bacterial genomes during the regulation of induced bacterial promoters. **Materials and methods.** A series of expression genetic constructs with *NifA* genes of nodule bacteria strains under the control of an inducible promoter Pm were created. The resulting constructs were transformed into strains of nodule bacteria. The obtained recombinant strains were investigated for the appearance of their nitrogen-fixing activity in the free-living state. **Results.** It was shown that the expression of *nifA* in recombinant cells of all three genera of bacteria leads to the appearance of insignificant nitrogenase activity. At the same time, the level of nitrogenase activity does not have a correlation with the level of expression of the introduced *nifA* gene, which, most likely, is a consequence of the multilevel regulation of nitrogen fixation. **Conclusion.** The possibility of artificial activation of nitrogenase activity in nodule bacteria in the free-living state by introducing the NifA regulatory protein gene into bacteria was shown.

Keywords: nitrogen fixation; nodule bacteria; *nifA*; recombinant bacteria; plasmid vector; promoter.

ВВЕДЕНИЕ

Усвоение молекулярного азота воздуха — один из важнейших биологических процессов, от которого во многом зависит жизнь на нашей планете. Наиболее эффективными азотфиксаторами являются клубеньковые бактерии (ризобии) в симбиозе только с бобовыми растениями (за некоторым исключением). Данные бактерии характеризуются высокой пластичностью генома, рекомбинационной активностью и активной вовлечен-

ностью в процессы горизонтального переноса генов. Наиболее интенсивно в горизонтальном переносе генов участвуют симбиотические гены *nif*, *fix*, *nod*. Основной способ горизонтального переноса генов у клубеньковых бактерий — конъюгация [1]. Из-за того что данный процесс часто прерывается, клетка не всегда успевает приобрести все гены, необходимые для детерминации азотфиксации, и недостающие гены бактерии теоретически может получить в следующем раунде

конъюгации. Поскольку в этом процессе могут участвовать не только представители одного вида, но и бактерии разных таксонов, то это приводит к комбинации *nif*-генов разных бактерий, что является элементом комбинативного эволюционного процесса [2–4]. Известно, что гены коровых белков нитрогеназы организованы в один оперон и наследуются преимущественно вместе, чего нельзя сказать о генах вспомогательных белков азотфиксации, образующих у многих азотфиксирующих бактерий отдельные опероны. Особенно это характерно для клубеньковых бактерий, у которых наблюдается разобщенность *nif*-генов по разным оперонам. С этой точки зрения данные микроорганизмы выступают удобным объектом для исследования комбинативной эволюции азотфиксации у бактерий. Ген *nifA* — один из наименее сцепленных с генами коровых белков, но тем не менее составляет неотъемлемую часть нитрогеназной системы ризобий, кодирует регуляторный белок NifA, от которого зависит запуск всей нитрогеназной системы микроорганизмов. Данный белок, будучи энхансерным элементом, запускает экспрессию всех генов, участвующих в процессе азотфиксации, и является конечным звеном в сигнальном каскаде активации генов нитрогеназного комплекса.

У симбиотических свободноживущих азотфиксаторов при избытке кислорода ген *nifA* находится в репрессированном состоянии. В результате этого не происходит экспрессии генов нитрогеназного комплекса [5] и выработки белков нитрогеназы, поэтому *ex planta* клубеньковые бактерии не проявляют азотфиксирующей активности. Но на сегодняшний день существуют работы по активации генов нитрогеназного комплекса у свободноживущих азотфиксаторов за счет изменения регуляции экспрессии гена *nifA* [6]. Известно, что конститутивная экспрессия данного гена у несимбиотических азотфиксаторов приводит к увеличению интенсивности азотфиксации [7], а также появлению нитрогеназной активности при избытке соединений азота в среде [8]. В настоящей работе мы оценили возможность индукции нитрогеназной активности у ризобий в свободноживущем состоянии при искусственной активации экспрессии гена *nifA* на детектируемом уровне. Это позволит использовать ген *nifA* клубеньковых бактерий в качестве удобного маркера при изучении функциональности гетерологичных комбинаций *nif*-генов, поскольку данный ген также: 1) является неотъемлемой частью азотфиксирующего аппарата всех ризобий; 2) не имеет жесткой сцепленности с генами коровых белков нитрогеназы. Таким образом, по появлению нитрогеназной активности у клубеньковых бактерий *ex planta* при искусственной активации гена *nifA* можно будет судить о функциональности данного гена в гетерологичной системе *nif*-генов.

Кроме того, возможность активации азотфиксации ризобий в сапрофитном состоянии может иметь и прак-

тическое значение. Показано, что некоторые штаммы ризобий могут выступать в качестве PGPR (от plant growth promoting *Rhizobacteria* — ризобактерии, способствующие росту растений) при ассоциативном взаимодействии с растениями [9, 10]. Придание им способности фиксировать азот *ex planta* может значительно улучшить их ростостимулирующие свойства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы штаммы бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт» *Rhizobium* sp. VSy9, *Ensofer* sp. Mlu10 и *Mesorhizobium* sp. LZh7, выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала, относящихся к трибам Fabaeae, Trifolieae и Loteae: горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.), люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) и лядвенца жигулевского (*Lotus zhegulensis* Klokov) соответственно, а также *E. coli* штамма XL1-Blue для генно-инженерных манипуляций.

Клубеньковые бактерии культивировали на среде JM (1 % маннитол, 0,05 % K_2HPO_4 , 0,02 % $MgSO_4$, 0,01 % NaCl, 0,1 % дрожжевой экстракт) при 28 °C, *E. coli* выращивали на среде LB (1 % бактотриптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 0,5 % NaCl) при температуре 37 °C. В качестве селективного антибиотика при трансформации использовали ампициллин (100 мг/мл). Экспрессию генов *nifA*, находящихся в составе плазмиды *pJB658*, активировали *m*-толуоловой кислотой (2 mM).

Тотальную ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1 % Triton X100 и 1 % суспензии Chelex100. Для этого в 1,5 мл пробирки со 100 мкл 1 % Triton X100 и 1 % суспензии Chelex100 помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95 °C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. В качестве матрицы для ПЦР брали надосадочную жидкость. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора diaGene («Диаэм», Россия).

В качестве основы для создания экспрессирующей плазмиды, несущей ген *nifA*, была выбрана плазида широкого круга хозяев *pJB658* с репликоном *RK2* [11, 12]. Последовательность целевого гена была наработана методом ПЦР с помощью праймеров *nifA*viciaNdeIF 5'-ttgtacatgatgattaaccagaggcgctccata-3' и *nifA*viciaBamHIR 5'-ttacgggatcctggcgatcggctcactcctctcaca-3', в состав которых были внесены сайты рестрикции: в передний праймер сайт рестрикции NdeI, в состав заднего праймера сайт рестрикции BamHI. Амплифицируемый продукт содержал ген *nifA* размером 1560 п. н. Наличие сайтов рестрикции на концах получаемого ПЦР-продукта облегчало направленное клонирование целевой последовательности и давало возможность попадания в рамку считывания (рис. 1).

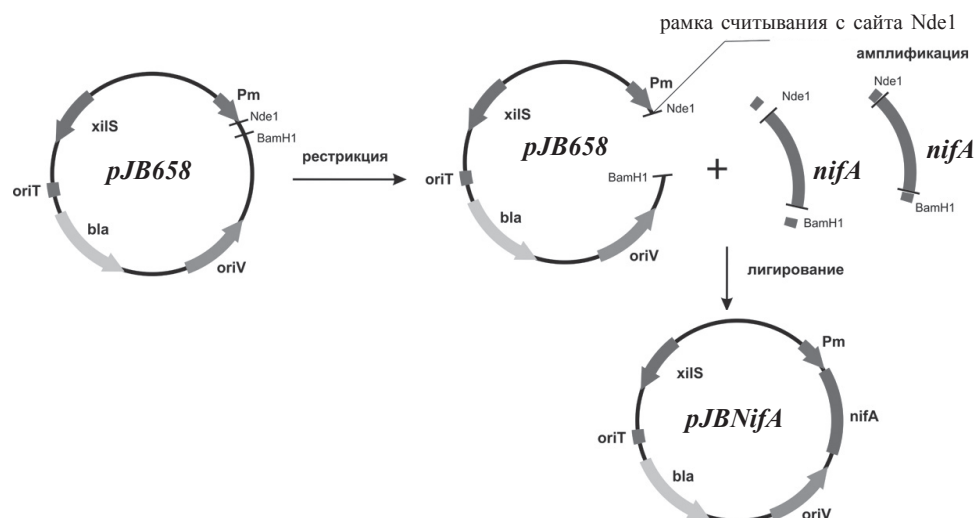


Рис. 1. Стратегия клонирования генов *nifA* в плазмиду *pJB658*

Трансформацию клеток векторными конструкциями проводили методом электропорации на приборе MicroPulser (BioRad, США) с помощью программы и протокола для трансформации агробактерий в 0,1 см электропорационной кювете. Электрокомпетентные клетки готовили согласно методике, описанной Лин [13].

Визуальное наблюдение флуоресцентно меченных бактерий осуществляли на флуоресцентном микроскопе Axiolmager M1 (Carl Zeiss, Германия). Для детекции GFP использовали набор светофильтров № 10 (полоса возбуждения BP — 450–490, испускание BP — 515–565).

Для оценки экспрессии *nif*-генов методом ОТ-ПЦР РНК выделяли с применением набора FastRNA Pro Blue Kit (США). Первую цепь ДНК, комплементарную мРНК, получали при помощи фермента MMLV-ревертазы (обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 42 °С в течение 2 ч. Реакционная смесь содержала 1–5 мкг РНК, 20 мкМ случайного гексамерного праймера (Fermentas, США), однократный буфер для ревертазы (50 мМ трис-НСl рН 8,3, 10 мМ $MnCl_2$, 10 мМ DTT, 0,5 мМ спермидина), по 500 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов и 5 единиц MMLV-ревертазы. После инкубации реакционную смесь инактивировали нагреванием до 70 °С 10 мин. Полученные образцы разделяли на алиquotы и для постановки ОТ-ПЦР использовали следующие праймеры:

- NifHF (5'-acgctagccgcccttgga-3'),
NifHR (5'-gagttcgcatcggtttgacg-3') для амплификации фрагмента гена *nifH* размером 513 п. н.,
- NifAF (5'-cggcagcgcgacggtgacatt-3'),
NifAR (5'-caagaggagcgcgaagaaca-3') для амплификации фрагмента гена *nifA* размером 246 п. н.

Белки из культуры клеток клубеньковых бактерий выделяли методом, описанным в работе [14]. Белки на PVDF-мембрану (BIO-RAD, США) для Вестерн-блот-анализа переносили согласно методике, описанной в работе [15], в приборе MiniTrans-Blot® Module 170—

3924EDU Bio-Rad (США) при 4 °С в течение 1 ч при напряжении 100 В и силе тока 18–22 мА. Для обнаружения белка NifH были использованы поликлональные куриные антитела, полученные к коровому белку нитрогеназы NifH (Agrisera, Швеция). Мембрану обрабатывали раствором антител, разведенных в 1000 раз в TBS-буфере (20 мМ трис-основание, 150 мМ NaCl) с добавлением 1 % сухого обезжиренного молока и 0,1 % Твин-20 и инкубировали в течение 10–16 ч в холодильнике (+4 °С). После этого раствор первичных антител сливали, а мембрану промывали в TBS-буфере с добавлением 0,1 % Твин-20.

Детекцию первичных связанных с антигеном антител на мембране выполняли с помощью вторичных моноклональных кроличьих антител на поликлональные куриные антитела, меченные пероксидазой хрена HRP (Agrisera, Швеция). Сыворотку разводили в объеме 0,2 мл MQ воды. Полученный раствор (2 мкл) разводили в 10 мл TBS-буфера с добавлением 0,01 % Твин-20. Мембрану инкубировали в растворе вторичных антител в течение 1,5–2 ч при комнатной температуре. Детекцию пероксидазы на мембране проводили с помощью хромогена DAB «Cell Marque Corporation» (США).

Для определения нитрогеназной активности микроорганизмы культивировали 1–2 суток на жидкой безазотной питательной среде с селективными антибиотиками и индукторами в необходимых концентрациях в термостатируемом орбитальном шейкере ES20 при 160 об/мин и оптимальной температуре роста 28 °С до числа КОЕ = $1 - 2 \cdot 10^8$. После этого от каждого образца отбирали по 1 мл культуральной жидкости и вносили в стерильные стеклянные флаконы объемом 15 мл. В каждый флакон предварительно было внесено по 5 г стерильного песка в качестве носителя. После внесения культуральной жидкости влажность песка составляла 60 % полной влагоемкости. Для каждого рекомбинантного штамма и штаммов-контролей ис-

пользовали по 10 флаконов с пробами в трех повторностях (30 проб на один штамм). Для контроля неспецифического этиленогенеза требовалось 10 флаконов с песком, влажность песка составляла 60 % полной влагоемкости. Флаконы, закрытые ватными пробками, инкубировали 24 ч при температуре 28 °С, после чего закрывали резиновыми пробками и внутрь каждого флакона вводили ацетилен до концентрации 10 % по объему. Через 1–1,5 ч инкубации шприцем отбирали пробы газа в объеме 1 мл. Содержание ацетилена и этилена определяли на газовом хроматографе Shimadzu Gas Chromatograph GC-2014 (Япония) с пламенно-ионизационным детектором по времени выхода каждого газа.

Содержание обменного аммония почвы определяли фотометрическим методом (ГОСТ 26489-85) в пяти повторностях. Для анализа использовали фильтраты вытяжек из почвы не инокулированной, инокулированной рекомбинантными и дикими вариантами штаммов ризобий. В 100 мл стеклянные колбы отбирали по 2 см³ фильтратов и раствора сравнения (раствор 0,25 мг/см³ NH₄Cl). Далее к пробам добавляли по 40 см³ окрашивающего раствора (раствор 5,7 % салициловокислого натрия, 1,7 % виннокислого калия-натрия, 2,7 % гидроксида натрия, 0,04 % нитропрусида натрия, 0,2 % трилона Б), затем по 2 см³ 0,125 % раствора NaOCl. Растворы тщательно перемешивали и через 1 ч фотометрировали на фотоэлектрическом фотометре КФК 3-01 в стеклянных кюветах толщиной просвечиваемого слоя 1 см относительно раствора сравнения при длине волны 655 нм. Каждый фильтрат измеряли в трех повторностях.

По результатам фотометрирования строили градуировочный график зависимости показаний фотоэлектроколориметра от концентрации аммония в пробах. Результат выражали в миллионных долях с округлением до первого десятичного знака.

Массовую долю азота нитратов в пересчете на сухую почву (X_1) в миллионных долях вычисляли по формуле: $X_1 = X \cdot K_1 \cdot K_2$, где X — массовая доля азота нитратов, млн⁻¹; K_1 и K_2 — коэффициенты, учитывающие массовую долю влаги в почве и увеличение экстрагирующего раствора, взаимодействующего с анализируемой пробой, за счет содержащейся в почве влаги.

Содержание нитратов определяли ионометрическим методом (ГОСТ 26951-86). Метод основан на извлечении нитратов раствором алюмокалиевых квасцов (1 % K₂SO₄) при соотношении массы пробы почвы и объема раствора 1 : 2,5 и последующем определении нитратов в вытяжке с помощью ионоселективного электрода. Для анализа использовали фильтраты вытяжек из почвы не обработанной, обработанной рекомбинантными штаммами и дикими штаммами клубеньковых бактерий. Пробы почвы массой 20 г помещали в конические стеклянные колбы. К пробам приливали

по 50 см³ 1 % раствора K₂SO₄. Пробу с раствором перемешивали в течение 3 мин. С помощью полученных суспензий рассчитывали содержание нитратов. Перед измерениями суспензии взбалтывали. Нитратный ионоселективный электрод тщательно ополаскивали дистиллированной водой и выдерживали его в дистиллированной воде в течение 10 мин. После этого электродную пару погружали в суспензию и считывали показания прибора не ранее чем через 1 мин после прекращения заметного дрейфа показаний прибора.

На основании определения ЭДС (в милливольтгах) в растворах сравнения строили градуировочный график зависимости показаний рН-метра милливольтметра от концентрации нитратов в пробах. Результат выражали в миллионных долях с округлением до первого десятичного знака.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день известно множество различных сигнальных каскадов запуска азотфиксации у бактерий. Последним этапом транскрипционной регуляции у многих азотфиксирующих бактерий, в том числе и микроорганизмов, входящих в состав группы клубеньковых бактерий, является запуск экспрессии генов нитрогеназного комплекса в результате их активации регуляторным белком NifA [16].

Нами были созданы серии генно-инженерных конструкций с генами *nifA* штаммов клубеньковых бактерий под управлением индуцируемого промотора *Pm* [17, 18], основой для которых послужила плазида широкого круга хозяев *pJB658* с репликоном T2: *pJB658nifAvicea*, *pJB658nifAMesorh*, *pJB658nifASinorh*, с генами *nifA* *Rhizobium* sp.VSy9, *Ensifer* sp. MLu10 и *Mesorhizobium* sp. LZh7 соответственно. Для того чтобы удостовериться в работоспособности конструкций на основе плазмиды *pJB658*, в штаммах ризобий была параллельно создана подобная конструкция, где вместо целевого гена был встроен репортерный ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP. При трансформации данной конструкцией ризобий *Rhizobium* sp. (VSy9), *Ensifer* sp. (MLu10) и *Mesorhizobium* sp. (LZh7) на среде с метилбензойной кислотой образовывались зеленоокрашенные клоны бактерий, что показывает функциональность промотора *Pm* в анализируемых бактериях. В дальнейшем конструкции с генами *nifA* были трансформированы в вышеперечисленные штаммы клубеньковых бактерий. В данной работе были созданы рекомбинантные штаммы на основе штаммов — доноров целевого гена. По сути, в бактериальные клетки была добавлена своя же копия гена *nifA*, но только регулируемая индуцируемым промотором. Полученные штаммы были проанализированы на появление у них азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии ацетиленовым методом.

При анализе рекомбинантного штамма *Rhizobium* sp.VSy9 с конструкцией *pJB658nifAvicea*

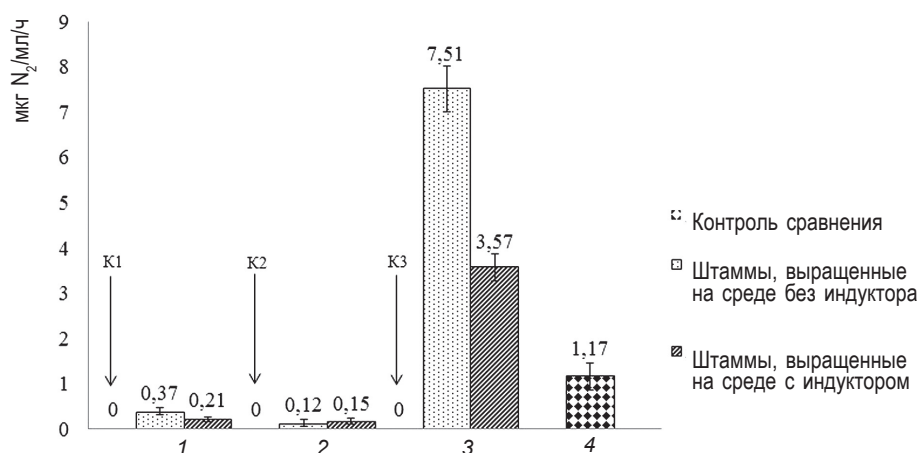


Рис. 2. Анализ нитрогеназной активности бактерий. 1 — *Rhizobium* sp. VSY9PmNifA; 2 — *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA; 3 — *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA; 4 — контроль (*Pseudomonas* sp. K749 — свободноживущий азотфиксатор). K₁, K₂, K₃ — дикие варианты штаммов клубеньковых бактерий

(штамм VSY9PmNifA) уже без индукции было обнаружено появление у исследуемых микроорганизмов нитрогеназной активности. Интересно, что при слабой индукции наработки NifA наблюдалось снижение активности азотфиксации (рис. 2).

Рекомбинантный штамм *Mesorhizobium* sp. LZh7 с конструкцией *pJB658nifAMesorh* (штамм LZh7PmNifA) также проявлял нитрогеназную активность вне растений. При этом минимальная индукция гена *nifA* не меняла достоверно уровень редукции ацетилена. Как известно, бактерии рода *Mesorhizobium* содержат две копии гена регуляторного белка NifA: *nifA1* и *nifA2* [19–21]. Поскольку в регуляции генов азотфиксации участвует вариант *nifA2* гена, а *nifA1*-копия не оказывала влияния на азотфиксирующую активность [22], в данной работе был использован только один вариант гена, гомологичный *nifA2*. Возникновение в нашем случае у рекомбинантного штамма *Mesorhizobium* sp. LZh7nifA способности восстанавливать ацетилен до этилена в свободноживущем состоянии подтверждает, что именно вариант *nifA2* гена регуляторного белка NifA участвует в активации нитрогеназного комплекса.

Совершенно неожиданный результат был получен при анализе рекомбинантного штамма *Ensifer* sp. Mlu10 с конструкцией *pJB658nifASinorh* (рекомбинантный штамм Mlu10PmNifA). У данных микроорганизмов была обнаружена способность к восстановлению ацетилена, превышающая более чем в 6 раз таковую у референтного штамма *Pseudomonas* sp. K749, при этом слабая индукция, так же как и в случае *Rhizobium* sp. VSY9PmNifA, приводила к снижению активности нитрогеназы. Скорее всего, для индукции азотфиксирующей активности достаточно незначительного количества регуляторного белка, а повышение его концентрации уже не оказывает прямого влияния на нитрогеназную активность бактерий, поскольку на данный процесс, вероятно, начинают воздействовать другие лимитирующие факторы [23–25].

Для проверки данного предположения был проведен ОТ-ПЦР-анализ экспрессии гена регуляторного белка *nifA*, а также одного из генов коровых белков нитрогеназы *nifH* у полученных нами рекомбинантных штаммов. Было обнаружено, что индукция промотора целевого гена *nifA* приводит к активации его транскрипции (выражено на фореграмме в виде появления соответствующих продуктов ПЦР, рис. 3), чего не наблюдается у неиндуцированных образцов. Судя по всему, при отсутствии индуктора нарабатывается незначительное количество матричной РНК целевого гена, в связи с чем детектировать ее не получается.

При анализе экспрессии гена *nifH* было обнаружено, что транскрипция данного гена у рекомбинантных штаммов наблюдается как при индукции экспрессии гена *nifA*, так и без нее (см. рис. 3).

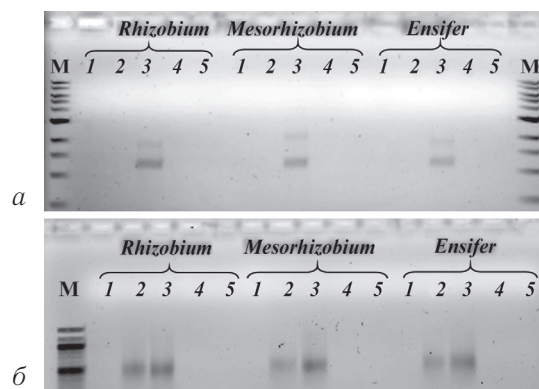


Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ транскрипционной активности генов *nifA* (а) и *nifH* (б) в клетках диких и рекомбинантных штаммов ризобий *Rhizobium* sp. VSY9, *Mesorhizobium* sp. LZh7, *Ensifer* sp. Mlu10. 1 — дикие штаммы бактерий; 2 — рекомбинантные штаммы бактерий без индукции; 3 — рекомбинантные штаммы бактерий с индукцией; 4 — ПЦР тотального препарата нуклеиновых кислот рекомбинантных бактерий после обработки ДНКазой; 5 — отрицательный контроль

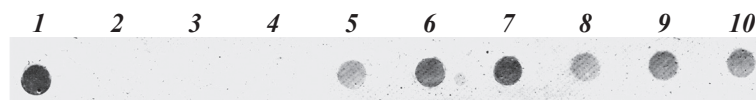


Рис. 4. Дот-блот-анализ продукции белка NifH рекомбинантными штаммами клубеньковых бактерий, выращенными на питательной среде без и с добавлением индуктора *m*-толуоловой кислоты (0,5 мМ). 1 — положительный контроль штамма *Pseudomonas* sp. K749; 2 — нерекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9; 3 — нерекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10; 4 — нерекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7; 5 — рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 6 — рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 7 — рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 8 — рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, культивируемый на среде с индуктором; 9 — рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, культивируемый на среде с индуктором; 10 — рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, культивируемый на среде с индуктором

Таким образом, общий уровень наработки матричной РНК гена *nifH* хотя и зависит от белка NifA, но не имеет прямой зависимости от уровня экспрессии ее гена, что еще раз подтверждает сложный многоуровневый механизм индукции азотфиксирующей активности у ризобий.

Штаммы на наличие белка NifH исследовали методом дот-блот-анализа, поскольку при использовании вестерн-блот-метода с разделением белков в полиакриламидном геле при анализе тотального белка рекомбинантных штаммов проявлялась только одна целевая полоса. Было показано, что NifH отсутствует у диких штаммов в свободноживущем состоянии. Во всех рекомбинантных штаммах белок NifH присутствует как при индукции привнесенного гена *nifA*, так и без нее (рис. 4).

Таким образом, искусственная активация гена *nifA* у всех взятых в анализ штаммов бактерий, относящихся к трем основным родам ризобий, приводит к появлению у них детектируемой нитрогеназной активности *ex planta*. Возникновение нитрогеназной активности без индукции целевого гена, возможно, объясняется так называемым «протеканием» промотора *Pm*, при котором наблюдается слабая экспрессия гена под управлением данного промотора. И та незначительная продукция целевого белка, которая происходит при этом, может вызывать индукцию нитрогеназной активности.

Взаимоотношение растений и ростостимулирующих микроорганизмов — сложный процесс, в котором задействованы продукты десятков, а то и более генов. Любые изменения в данном механизме могут повлиять на взаимодействия с растениями. Мы проверили как сказались изменения регуляции азотфиксации у рекомбинантных ризобий на способность образовывать

клубеньки по сравнению с их исходными дикими штаммами.

Было выявлено, что привнесение в клетки ризобий дополнительной копии *nifA* под управлением бактериальных промоторов несущественно повлияло на их способность к клубенькообразованию. Разница с дикими типами штаммов не имела достоверных различий (данные не показаны). Исключение составил рекомбинантный штамм *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, показавший наибольшую нитрогеназную активность, инокуляция которым не приводила к образованию клубеньков. Вероятно, у данного штамма за счет рекомбинации произошли более существенные изменения экспрессии генов, участвующих в образовании симбиоза с растением-хозяином, по сравнению с другими рекомбинантными штаммами.

Поскольку штамм *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA продемонстрировал высокую азотфиксирующую активность, нами было исследовано изменение в почве количества азотных соединений при внесении в нее данных бактерий. Было обнаружено, что через 30 дней после инокуляции почвы бактериями содержание в ней аммонийного азота существенно увеличилось. Но в то же время количество нитратного азота значительно уменьшилось (табл. 1). Это может говорить о том, что бактерии данного штамма способны переключаться на нитратное дыхание, блокируя поступление кислорода. Именно это обстоятельство, вероятно, позволяет им проявлять высокую азотфиксирующую активность. Такая возможность уже была показана для *E. meliloti* 1021 при первоначальной инкубации в условиях низкой концентрации кислорода (2 %) [26]. Способность клубеньковых бактерий к денитрифика-

Таблица 1

Анализ состава и количества азотных соединений в почве

Образец	NH ₄ сол., мг/кг	NO ₃ квасц., мг/кг
Почва без обработки	30,86 ± 3,2	1050 ± 11
Инокуляция диким штаммом <i>Ensifer</i> sp. Mlu10	31,15 ± 2,7	1050 ± 13
Инокуляция рекомбинантным штаммом <i>Ensifer</i> sp. Mlu10PmNifA	83,6 ± 1,6	355 ± 7

ции играет ключевую роль в предотвращении раннего образования клубеньков [27, 28]. Потеря рекомбинантными штаммами способности к клубенькообразованию и появление у них нитратного дыхания могут быть взаимосвязаны.

Таким образом, посредством изменения регуляции экспрессии гена *nifA* возможно индуцировать у клубеньковых бактерий азотфиксирующую активность вне растений. Степень данной активности не напрямую зависит от уровня экспрессии регуляторного белка. Нитрогеназная активность у рекомбинантных по гену *nifA* штаммов при этом имеет уверенно детектируемый уровень, хотя он значительно ниже такового у свободных азотфиксаторов. В отдельных случаях рекомбинантные штаммы могут проявлять суперазотфиксирующие свойства, которые значительно превосходят данные свойства у свободноживущих азотфиксаторов.

Работа выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АА-АА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-00034 мол_а, № 18-34-20004 мол_а_вед и гранта по инновационным исследованиям «У.М.Н.И.К.» А.А. Владимировой (№ 12605ГУ/2017). Создание плазмидных экспрессионных конструкций осуществлено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-74-30012).

ЛИТЕРАТУРА

- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. — СПб.: Информ-Навигатор, 2012. [Provorov NA, Vorob'ev NI. Geneticheskie osnovy evolyutsii rastitel'no-mikrobnogo simbioza. Saint Petersburg: Inform-Navigator; 2012. (In Russ.)]
- Dludlu MN, Chimphango SBM, Walker G, et al. Horizontal gene transfer among Rhizobia of the Core Cape Subregion of Southern Africa. *S Afr J Bot.* 2018;118:342-52. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.406>.
- Andrews M, De Meyer S, James EK, et al. Horizontal transfer of symbiosis genes within and between Rhizobial Genera: Occurrence and Importance. *Genes (Basel).* 2018;9(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070321>.
- Ling J, Wang H, Wu P, et al. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(48):13875-13880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615121113>.
- Dixon R, Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(8):621-31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>.
- Kennedy C, Robson RL. Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter* by the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature.* 1983;301(5901):626-628. <https://doi.org/10.1038/301626a0>.
- Kim Y-M, Hidaka M, Masaki H, et al. Constitutive expression of nitrogenase system in *Klebsiella oxytoca* by gene targeting mutation to the chromosomal *nifLA* operon. *J Biotechnol.* 1989;10(3-4):293-301. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90073-4).
- An Q, Dong Y, Wang W, et al. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph. *J Appl Microbiol.* 2007;103(3):613-620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03289.x>.
- Chabot R, Antoun H, Kloepper JW, Beauchamp CJ. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(8):2767-2772.
- Chao WL. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. *Lett Appl Microbiol.* 1990;10(5):213-215. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb01336.x>.
- Blatny JM, Brautaset T, Winther-Larsen HC, et al. Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. *Plasmid.* 1997;38(1):35-51. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1294>.
- Sletta H, Nedal A, Aune TE, et al. Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(12):7033-7039. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7033-7039.2004>.
- Lin JJ. Electrotransformation of *Agrobacterium*. In: *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana Press; 1995. P. 171-178.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(9):4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- Mongiardini EJ, Ausmees N, Perez-Gimenez J, et al. The Rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of Rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;65(2):279-288. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00467.x>.
- Tsoy OV, Ravcheev DA, Cuklina J, Gelfand MS. Nitrogen fixation and molecular oxygen: comparative genomic reconstruction of transcription regulation in Alphaproteobacteria. *Front Microbiol.* 2016;7:1343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01343>.
- González-Pérez MM, Marqués S, Domínguez-Cuevas P, Ramos JL. XylS activator and RNA polymerase binding sites at the Pm promoter overlap. *FEBS Letters.* 2002;519(1-3):117-122. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02730-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02730-8).

18. Brautaset T, Lale R, Valla S. Positively regulated bacterial expression systems. *Microb Biotechnol.* 2009;2(1):15-30. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00048.x>.
19. Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, et al. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol.* 2002;184(11):3086-3095. <https://doi.org/10.1128/jb.184.11.3086-3095.2002>.
20. Sullivan JT, Brown SD, Ronson CW. The NifA-RpoN regulon of *Mesorhizobium loti* strain R7A and its symbiotic activation by a novel LacI/GalR-family regulator. *PLoS One.* 2013;8(1): e53762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053762>.
21. Gamez-Reyes A, Becerra-Lobato N, Ramirez-Trujillo JA, et al. The *Rhizobium leucaenae* CFN299 pSym plasmid contains genes expressed in free life and symbiosis, as well as two replication systems. *Ann Microbiol.* 2017;67(3): 263-73. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1257-3>.
22. Nukui N, Minamisawa K, Ayabe S, Aoki T. Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene nifA2 in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):4964-4969. <https://doi.org/10.1128/AEM.02745-05>.
23. Oelze J. Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(4):321-333. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00545.x>.
24. Boyd ES, Costas AM, Hamilton TL, et al. Evolution of molybdenum nitrogenase during the transition from anaerobic to aerobic metabolism. *J Bacteriol.* 2015;197(9):1690-9. <https://doi.org/10.1128/JB.02611-14>.
25. Boyd ES, Peters JW. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front Microbiol.* 2013;4:201. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>.
26. Torres MJ, Rubia MI, de la Pena TC, et al. Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* 2014;14:142. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-142>.
27. Bobik C, Meilhoc E, Batut J. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 2006;188(13): 4890-4902. <https://doi.org/10.1128/JB.00251-06>.
28. Cabeza R, Koester B, Liese R, et al. An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 2014;164(1):400-411. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228312>.

✉ Информация об авторах

Андрей Ханифович Баймиев — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: baymiev@anrb.ru.

Роман Сергеевич Гуменко — младший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

Анастасия Андреевна Владимирова — аспирант лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

Екатерина Сергеевна Акимова — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

Зиля Рифовна Вершинина — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: zilyaver@mail.ru.

Алексей Ханифович Баймиев — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов. Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр» Российской академии наук, Уфа. E-mail: alex@anrb.ru.

✉ Information about the authors

Andrey K. Baymiev — PhD, Leading Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: baymiev@anrb.ru.

Roman S. Gumenko — Junior Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: r.gumenko@yandex.ru.

Anastasiya A. Vladimirova — Graduate Student, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: vladimirovaw@bk.ru.

Ekaterina S. Akimova — PhD, Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: iv.katerina-bio@yandex.ru.

Zilya R. Vershinina — PhD, Researcher, Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: zilyaver@mail.ru.

Aleksey K. Baymiev — PhD, Head of Laboratory of Plant and Microbial Bioengineering. Institute of Biochemistry and Genetics — Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia. E-mail: alex@anrb.ru.