



© О. П. Онищук,
Е. П. Чижевская, О. Н. Курчак,
Е. Е. Андронов, Б. В. Симаров

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*, ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА С ЛЮЦЕРНОЙ *MEDICAGO SATIVA*

ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии Россельхоза-
кадемии, Санкт-Петербург

✿ С использованием Tп5-мутагенеза у штамма СХМ1-105 *Sinorhizobium meliloti* получено 3 мутанта, обладающих повышенной эффективностью симбиоза с люцерной. Показано, что инсерции Tп5 маркировали 2 хромосомных гена, кодирующих 5-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин деаминазу (мутант Т4) и белок-регулятор транскрипции GntR семейства (мутант М3), а также ген биосинтеза тиамин *thiC*, локализованный на мегаплазмиде 2 (мутант Т795). Мутант Т795 наряду с повышенной симбиотической эффективностью проявлял сниженную способность конкурировать за образование клубеньков с родительским штаммом СХМ1-105.

✿ **Ключевые слова:** *Sinorhizobium meliloti*; симбиотическая эффективность; конкурентоспособность; люцерна; генотипические взаимодействия партнеров симбиоза; солевой стресс; метод «инвертированной» ПЦР.

ВВЕДЕНИЕ

Клубеньковые бактерии люцерны — *Sinorhizobium meliloti* (Dangeard) являются одними из наиболее активных симбиотических азотфиксаторов: количество фиксируемого N₂ обычно составляет 150–250 кг/га, а при использовании высокоэффективных комбинаций «сорт–штамм» может быть увеличено до 550 кг/га в год (Кожемяков, Тихонович, 1998). Поэтому получение штаммов с повышенной симбиотической эффективностью (СЭ) и подбор оптимальных условий для формирования симбиоза является актуальной задачей. Под СЭ понимается способность ризобияльного штамма увеличивать массу инокулированных растений и содержание в ней азота. В настоящее время происходит активное развитие генетики и молекулярной биологии клубеньковых бактерий. Для представителей ряда видов клубеньковых бактерий, в том числе и для типового штамма 1021 *S. meliloti* уже проведено полногеномное секвенирование (Capela et al., 2001; Barnet et al., 2001; Finan et al., 2001). Однако генетические детерминанты, принимающие участие в контроле эффективности бобово-ризобияльного симбиоза, остаются до сих пор недостаточно изученными.

Ранее с использованием Tп5-мутагенеза в лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии у *S. meliloti* была получена серия мутантов, превышающих по СЭ исходные штаммы СХМ1-105 и СХМ1-188, на 20–30 %. Такой фенотип был обозначен Eff⁺⁺, а гены, мутации в которых приводят к его появлению, были названы «генами эффективности» (*eff*-гены) (Sharypova et al., 1994).

Молекулярно-биологический анализ *eff*-генов клубеньковых бактерий показал, что СЭ является полигенным признаком и контролируется сложной системой генов (Sharypova et al., 1994, 1999; Olach et al., 2001). При этом инактивация одних генов в результате мутаций может приводить к снижению или полной утрате СЭ, в то же время инактивация других генов — к возрастанию СЭ. Первая группа — это хорошо изученные гены биосинтеза фермента нитрогеназы (*nif*), ее снабжения электронами (*fix*) и энергетическими субстратами (*dct*), а также гены синтеза сигнальных Nod-факторов, обеспечивающих формирование клубеньков (*nod*). Ко второй группе относятся гены, контролирующие некоторые стадии углеродного обмена, а также поверхностные компоненты клетки, которые важны для развития бактерий в почве, но могут ингибировать развитие симбиоза.

Целью нашего исследования является выявление у штамма СХМ1-105 *S. meliloti* новых генов, принимающих участие в контроле эффективности симбиоза с люцерной. Нами впервые показано, что мутации, повышающие СЭ, могут затрагивать гены, кодирующие транскрипционные регуляторы, гены метаболизма фосфонатов, а также биосинтеза тиамин. Для идентификации *eff*-генов впервые был использован адаптированный метод «инвертированной» полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий упростить процедуру выделения из генома мутантного штамма фрагментов ризобияльной ДНК, фланкирующих транспозон.

Поступила в редакцию 25.12.2013
Принята к публикации 27.02.2014

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и плазмиды. Объектами исследования являлись лабораторный штамм СХМ1-105 клубеньковых бактерий люцерны *S. meliloti* (Eif⁺Sm^r — мутант производственного штамма 425a) (Федоров, Симаров, 1987) и полученные на его основе Tn5-мутанты T795, M3 и T4. Для проведения неспецифического транспозонного мутагенеза использовали векторную плазмиду-«самоубийцу» pSUP5011 (Tn5-*mob*) (Simon et al., 1983), которую вводили в штамм СХМ1-105 из штамма S17-1 *Escherichia coli* методом конъюгации (Чижевская с соавт., 2011).

Условия культивирования. Штаммы клубеньковых бактерий *S. meliloti* культивировали при 28 °С на среде ТУ (Beringer, 1974). При выращивании штаммов в жидкой среде проводили дополнительную аэрацию на лабораторной качалке (180 об/мин). В селективные среды добавляли антибиотики в следующих концентрациях (мг/л): стрептомицин (Sm) — 800, канамицин (Km) — 200.

Анализ роста штаммов на диагностических средах. Для предварительного отбора Tn5-мутантов по СЭ использовали диагностические среды: 79 (г/л: K₂HPO₄ — 0,5; MgSO₄×7H₂O — 0,5; NaCl — 0,1; дрожжевой экстракт — 1,0; CaCO₃ — следы; маннит — 10,0; pH — 7,0), содержащую 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (ТТХ, 0,01 %) — для отбора мутантов по дыхательной активности (Юргель с соавт., 1998); среду 79, содержащую гербицид 2-метил-4-хлорфеноксималяную кислоту (2 М-4ХМ, 0,1 %), ингибирующий дыхание бактерий; а также минимальную среду (г/л: K₂HPO₄—0,5; MgSO₄×7H₂O — 0,2; NaCl — 0,1; NH₄NO₃ — 0,1; CaCO₃ — следы; маннит — 10,0; pH — 7,0) с красителем Конго красный (0,02 %) — для отбора мутантов с измененной продукцией полисахаридов (Онищук с соавт., 2005). СЭ мутантов, проявивших измененный фенотип на этих средах (рост или окраску колоний по сравнению с родительским штаммом СХМ1-105) изучали в симбиозе с люцерной в условиях микровегетационного опыта.

Анализ симбиотических свойств. Растения люцерны *Medicago sativa* сортов Вега, Солеустойчивая и Агния выращивали в стерильных пробирках на агаризованной среде Красильникова-Кореняко (Федоров, Симаров, 1987). Для инокуляции каждой пробирки использовали 1 мл суспензии клеток клубеньковых бактерий (10⁷–10⁸ клеток в мл). Растения выращивали в теплице при температуре 20–22 °С, дополнительном освещении в 20000 лк и 16-часовом фотопериоде в течение 30 дней, опыты проводили в 6–8 повторностях. Симбиотическую эффективность штаммов оценивали по сухой надземной массе инокулированных растений люцерны относительно родительского штамма СХМ1-105. Для создания стрессовых условий в агаризованную среду Красильникова-Кореняко вносили 0,3 % или 0,6 % NaCl.

Удельное содержание азота (%) измеряли с помощью автоматизированной системы Kjeltec-Auto (Tecator, Mif'd, USA) и прибора «Elementar Analyser» (Carlo Erba, mod. 1160). Общее накопление азота (мг/пробирку) вычисляли, умножая значения содержания азота в растениях на их сухую массу.

Конкурентоспособность штаммов *S. meliloti* определяли по соотношению количества клубеньков, образованных мутантом при совместной инокуляции с родительским штаммом СХМ1-105, к общему количеству клубеньков. Штаммы смешивали в растворе микроэлементов при равной оптической плотности суспензий и полученную смесь (≈10⁸ клеток/мл) использовали для инокуляции 2-суточных проростков люцерны. Через 30 суток после инокуляции бактерии выделяли из клубеньков и анализировали их рост на среде ТУ с антибиотиками или без них. Долю клубеньков, содержащих Km^r клоны (мутант), сопоставляли с долей Km^r клонов в исходном инокулюме, которую определяли после его посева на среду ТУ с антибиотиками.

Манипуляции с ДНК. Выделение геномной ДНК штаммов *S. meliloti* (Meade et al., 1982), а также ее рестриктицию эндонуклеазами, лигирование и электрофорез в агарозном геле (Маниатис с соавт., 1984) проводили по стандартным методикам.

Для выделения из генома фрагментов, несущих инсерцию транспозона, использовали адаптированный нами метод «инвертированной» ПЦР. Для этого геномную ДНК изучаемых мутантов обрабатывали эндонуклеазой *MspI*, затем проводили лигирование фрагментов «на себя». 10–20 нг полученной смеси ДНК-фрагментов использовали в качестве матрицы в ПЦР с предварительно сконструированными праймерами М-1 (5'-CCACATTCGACACCGTAGGA-3') и М-2 (5'-GCCGCCGAAGAGAACACAGAT-3'). Протокол проведения ПЦР: [предварительная денатурация — 95 °С, 3 мин]; [денатурация — 94 °С, 30 с, отжиг праймеров — 54 °С, 30 с, синтез ДНК — 72 °С, 40 с] — 30 циклов; [финальный синтез ДНК — 72 °С, 5 мин]. Разделение полученных ПЦР-продуктов проводили в 3%-м агарозном геле.

Выделение фрагментов ДНК из геля. Искомый фрагмент вырезали из геля под УФ-светом и помещали в пластиковую микроцентрифужную пробирку. Добавляли 500 мкл раствора GITC [3 М гуанидинизотиоцианат, 20 mM ЭДТА, 10 mM ТРИС-НСl (pH = 6,8), 40 мг/мл TRITON X-100] и инкубировали при 65 °С, периодически встряхивая содержимое, до полного растворения агарозы. Затем добавляли 30–40 мкл суспензии SILICA [40 мг диоксида кремния (Sigma) в 1 мл раствора GITC] и аккуратно перемешивали в течение 5 мин. Диоксид кремния осаждали центрифугированием (1 мин, 700 g), удаляли надосадочную жидкость, повторяли центрифугирование и полностью удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 150 мкл промы-

Таблица 1

Фенотипы Tn5-мутантов *S. meliloti* на диагностических средах

Мутанты	Отличия мутантов от родительского штамма*
T795	Образует бесслизистые колонии на среде 79, усилена окраска на минимальной среде с Конго красным, слабый рост на минимальной среде
M3	Не окрашивается на среде с ТТХ
T4	Отсутствует рост на среде 79 с гербицидом 2 М-4ХМ

* — родительский штамм СХМ1-105 образует слизистые колонии на среде 79, растет на минимальной среде, окрашивается на среде с ТТХ и растет на среде 79 с гербицидом 2М-4ХМ. Жирным шрифтом выделена среда, на которой первоначально был отобран мутант

вочного раствора [25 % (v/v) изопропанол, 25 % (v/v) этанол, 100 mM NaCl, 10 mM ТРИС-НСl (pH=8,0)], центрифугировали в том же режиме и удаляли супернатант. Осадок промывали в 150 мкл 96%-го этилового спирта, повторяли центрифугирование и полностью удаляли этанол. Осадок подсушивали в течение 3–5 мин до полного испарения этанола и ресуспендировали в 20 мкл раствора для элюирования [ТРИС-НСl (pH=8,5)]. Пробу прогревали при 65 °С в течение 5 мин, периодически встряхивая содержимое. Диоксид кремния осаждали центрифугированием (1–2 мин, 14000 g), а надосадочную жидкость аккуратно отбирали в новую микроцентрифужную пробирку.

Секвенирование фрагментов ДНК. У выделенных фрагментов ДНК определяли их нуклеотидную последовательность с помощью автоматического секвенатора ABI 3500xL по методике фирмы-изготовителя.

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Vector NTI Suite 8. Для сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с базами данных были использованы следующие интернет-ресурсы: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://lipm-bioinfo.toulouse.inra.fr>.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа, а также вычисления стандартных ошибок долей (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор Eff⁺-мутантов штамма СХМ1-105 *S. meliloti*

На первом этапе работы было получено и проверено на диагностических средах 1000 Km^r (маркер Tn5) транспозантов штамма СХМ1-105 *S. meliloti*. Из них было отобрано 100 мутантов, которые отличались от родительского штамма по фенотипу (росту, слизееобразованию или окрашиванию колоний). У этих транспозантов была проанализирована СЭ в условиях стерильного микровегетационного опыта в симбиозе с люцерной *M. sativa* (сорт Вега). В итоге было отобрано 3 мутанта (Т795, М3 и Т4), которые проявили повышенную СЭ относительно родительского штамма. Мутанты превосходили штамм СХМ1-105 на 23,6–33,9 % по массе растений и на 25,6–35,8 % по общему накоплению азота в растениях (рис. 1). Отобранные мутанты характеризовались различными фенотипами на использованных диагностических средах (табл. 1).

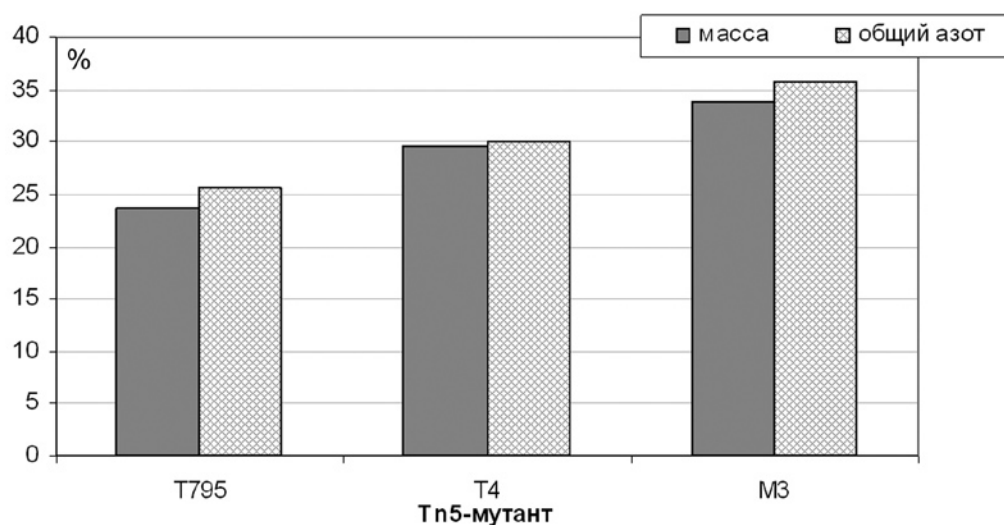


Рис. 1. Влияние инокуляции Tn5-мутантами на продуктивность растений люцерны *Medicago sativa* сорта Вега. Прибавки представлены в процентах к родительскому штамму СХМ1-105, который принят за 0. Масса растений, инокулированных штаммом СХМ1-105 = 36,4 мг. Все прибавки, определенные с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа, являются статистически достоверными ($P_0 < 0,05$)

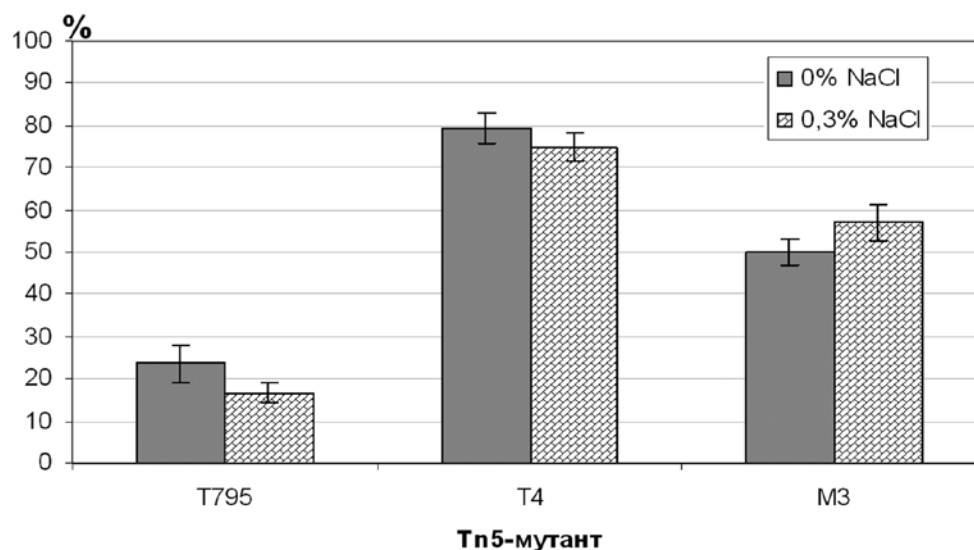


Рис. 2. Конкуrentоспособность Тn5-мутантов относительно родительского штамма CXM1-105 *S. meliloti*. Доли (%) мутантных штаммов в клубеньках представлены со стандартными ошибками

Анализ конкурентоспособности *Eff*⁺-мутантов

Экологически важным симбиотическим признаком клубеньковых бактерий является способность штаммов конкурировать между собой за образование клубеньков на корнях растений-хозяев (Онищук с соавт., 2001; Проворов с соавт., 2013). Поэтому наряду с СЭ была изучена конкурентоспособность (КС) полученных *Eff*⁺-мутантов в микровегетационных опытах на люцерне сорта Вега. Оказалось, что мутант Т795 обладал пониженной способностью конкурировать за формирование клубеньков на корнях люцерны относительно родительского штамма (КС = 23,5%), мутант Т4 превышал по данному признаку штамм CXM1-105 (КС = 79,5%), а мутант М3 не отличался по КС от этого штамма (КС ≈ 50%) (рис. 2). Внесение 0,3% NaCl влияло на КС штаммов незначительно: мутанты М3 и Т4 не отличались по КС от CXM1-105, а Т795 имел достоверно сниженную КС (рис. 2).

Влияние генотипа растения-хозяина и солевого стресса на СЭ ризобий

Известно, что проявление мутаций, изменяющих СЭ ризобий, существенно зависит от генотипа растения-хозяина и условий внешней среды (Проворов, Воробьев, 2012). Поэтому мы проанализировали СЭ полученных мутантов на других сортах люцерны — Солеустойчивая и Агния в стандартных условиях и при внесении NaCl в дозе 0,6%, моделирующей солевой стресс для ризобий люцерны (Ибрагимова с соавт., 2006). Оказалось (табл. 2), что на данных сортах люцерны мутанты уступали по СЭ родительскому штамму при выращивании без соли. В то же время в условиях солевого стресса мутанты превосходили по СЭ штамм CXM1-105 на сорте Агния, хотя уступали ему на сорте Солеустойчивая.

Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что без действия солевого стресса основным фактором варьирования массы инокулированных

Таблица 2

Влияние инокуляции Тn5-мутантами на массу растений люцерны (мг) в зависимости от сортового генотипа и действия солевого стресса

Штаммы <i>S. meliloti</i>	Сорт Солеустойчивая		Сорт Агния	
	без NaCl	с NaCl*	без NaCl	с NaCl*
М3	26,4 (–)	12,7 (–)	19,8 (–)	20,3 (+)
Т4	25,9 (–)	18,7 (–)	15,6 (–)	15,6 (+)
Т795	23,4 (–)	12,9 (–)	17,1 (–)	19,2 (+)
CXM1-105	28,5	21,6	25,4	12,3
Контроль без инокуляции	9,1	9,7	7,1	8,5
НСР _{0,05}	1,67		1,77	

* — в среду для выращивания люцерны вносили 0,6% NaCl. (+) и (–) достоверность отличий от инокуляции родительским штаммом CXM1-105 при $P_0 < 0,05$, была оценена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа

Таблица 3

Относительные вклады генотипов партнеров в общее варьирование массы инокулированных растений люцерны, принятое за 100% (по данным двухфакторного дисперсионного анализа)

Факторы	Условия опыта	
	без NaCl	с NaCl
Мутант бактерий	8,5	31,8
Сорт растений	78,9	7,3
Мутант × Сорт	2,1	29,9
Неконтролируемые факторы	10,5	21,0

растений люцерны является сортовой генотип, а влияние на нее генотипа бактерий и его взаимодействия с генотипом растений невелико. Однако при воздействии стресса наиболее значимым фактором изменения массы растений оказывается генотип бактерий, а также специфичность их взаимодействия с сортами, что говорит о важной роли симбиоза в развитии растений, находящихся в неблагоприятных условиях (табл. 3).

Использование метода «инвертированной» ПЦР для молекулярно-биологического анализа генов, маркированных Tn5

Для выделения из генома изучаемых мутантов фрагментов ДНК, содержащих транспозон, был использован адаптированный нами метод «инвертированной» ПЦР, который достаточно широко используется для выделения и анализа фрагментов ДНК, прилегающих к региону с известной последовательностью. В нашем случае этим регионом являлся Tn5, а проведение молекулярно-биологического анализа прилегающих к нему участков позволило бы выяснить, какие гены затронуты inserцией.

Адаптация метода включала в себя подбор фермента рестрикции, используемого при приготовлении ДНК-матрицы для проведения «инвертированной» ПЦР, и в конструировании специальных праймеров M-f и M-g.

В качестве фермента рестрикции была выбрана частотящающая рестриктаза *MspI*, использование которой дает возможность получить фрагменты ризобияльной ДНК, размер которых не превышает 1 т. п. н. и является оптимальным для их последующей ПЦР-амплификации. После расщепления геномной ДНК изучаемых мутантов *MspI* была проведена реакция лигирования *MspI*-рестриктвов «на себя», что позволило получить набор ДНК-фрагментов в кольцевой форме, которые и выступили в качестве матрицы в «инвертированной» ПЦР.

Следует сказать, что Tn5 имеет достаточно большой размер (5,8 т. п. н.) и содержит 49 сайтов для рестриктазы *MspI*, при этом первый из *MspI*-сайтов расположен на расстоянии 543 п. н. от концевых участков транспозона. Для проведения «инвертированной» ПЦР были сконструированы ориентированные в противоположном направлении праймеры M-g и M-f, сайты отжига для которых расположены в пределах указанного 543 п. н. *MspI*-фрагмента транспозона (на расстоянии 52–71 п. н.

и 252–272 п. н. от концевых участков Tn5, соответственно). Поскольку транспозон Tn5 содержит на своих концах идентичные IS-элементы, использование указанных праймеров позволяет провести одновременную ПЦР-амплификацию двух фрагментов ДНК, прилегающих справа и слева к транспозону.

Использование такого подхода позволило для каждого из изучаемых мутантов провести ПЦР-амплификацию двух фрагментов ДНК, фланкирующих Tn5 и ограниченных сайтом рестрикции для фермента *MspI*. Эти фрагменты были выделены из агарозного геля и секвенированы с использованием тех же M-g и M-f праймеров.

При анализе их нуклеотидных последовательностей было установлено, что Tn5-инсерция у мутанта T4 произошла в кодирующую область хромосомного гена, который у типового штамма 1021 обозначен *mtaD* (SMc02421). Он кодирует фермент 5-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин деаминазу, принимающий участие в метаболизме фосфонатов (Carola et al., 2001). У мутанта M3 inserцией транспозона инактивирован хромосомный ген (SMc00829), кодирующий один из предполагаемых регуляторов транскрипции GntR-семейства. У мутанта T795 inserция Tn5 произошла в кодирующую область гена *thiC* (SMb20615), который расположен на мегаплазмиде-2 и принимает участие в биосинтезе тиамин (Finan et al., 2001).

ОБСУЖДЕНИЕ

Важным резервом повышения активности симбиотрофного питания растений азотом является модификация у бактерий наследственных факторов, которые ограничивают СЭ, не будучи непосредственно связанными с процессом азотфиксации. У *S. meliloti* гены, контролируемые СЭ, были выявлены путем анализа Tn5-мутантов, отобранных по способности повышать массу инокулированных растений люцерны (Sharypova et al., 1994).

При изучении выявленных ранее генов, влияющих на СЭ, было показано, что *eff*-гены могут быть локализованы в различных частях генома (как на хромосоме, так и на мегаплазмидах), при этом ни один из них не был связан непосредственно с работой нитрогеназной системы (Sharypova et al., 1992, 1994; Sharypova, Simarov, 1995; Чижевская с соавт., 1998). Например, были идентифи-

цированы *eff*-гены, контролирующие транспорт в клетку сахаров и синтез аденилатциклазы, инактивация которых может повышать эффективность усвоения бактероидами дикарбоновых кислот — основных энергетических субстратов, используемых при симбиотической азотфиксации. Кроме того, было показано, что на СЭ может влиять ген *eglC*, ответственный за деполимеризацию экзополисахарида-1, который участвует во взаимодействии ризобий с защитными факторами растений (Sharypova et al., 1999).

В нашей работе выявлено три новых гена, участвующих в контроле СЭ *S. meliloti*. Мутации в этих генах оказывают на бактерии плеiotропный эффект, затрагивая не только СЭ, но и культурально-биохимические признаки (выявляемые на диагностических средах), которые могут быть использованы в качестве маркеров *eff*-генов при анализе СЭ. Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности применения диагностических сред (минимальная с Конго красным, среда 79 с ТТХ или 2М-4ХМ) для скрининга мутантов, обладающих повышенной СЭ.

Для выявления генов, мутации в которых приводят к появлению Eff⁺⁺-фенотипа, был использован специально адаптированный нами метод «инвертированной» ПЦР. Указанный метод позволил быстро (без длительных и трудоемких процедур клонирования) провести выделение фрагментов ДНК, фланкирующих транспозон, что говорит о перспективности данного метода для последующего использования.

Молекулярно-биологический анализ позволил нам выявить ген *mtaD* (SMc02421), кодирующий 5-метилтиоаденозин/S-аденозилгомоцистеин деаминазу (N-этиламмелин хлоргидролаза). Этот фермент относится к семейству металло-зависимых гидролаз и принимает участие в метаболизме фосфонатов, в том числе некоторых пестицидов и гербицидов. Полученные результаты согласуются с нашими данными о том, что большинство Tп5-мутантов, отобранных на среде с 2,3,5-трифенилтетразолия бромидом были чувствительны к хлорсодержащему гербициду 2М-4ХМ (ингибитор дыхательной активности бактериальных штаммов). Эти мутанты также обладали повышенной дыхательной активностью (Red⁺⁺) и СЭ (Юргель с соавт., 1998).

Второй ген SMc00829, участвующий в контроле СЭ, кодирует гипотетический протеин. При анализе его аминокислотной последовательности обнаружены домены, характерные для белков — регуляторов транскрипции GntR семейства. Однако конкретная роль данного гена в развитии симбиоза пока остается неизвестной.

Третий ген *thiC* (SMb20615), участвующий в биосинтезе тиамина, помимо влияния на СЭ участвует также в контроле конкурентоспособности. Роль этого гена в контроле КС была выявлена ранее у штамма 1021 *S. meliloti* (Pobigailo et al., 2008), однако новизна наших данных заключается в доказательстве влияния гена *thiC* на СЭ.

Поскольку многие мутанты клубеньковых бактерий, аукотрофные по тиамину, утрачивают способность к фиксации азота (Finan et al., 1986), можно предположить, что у *S. meliloti* имеется несколько альтернативных путей биосинтеза тиамина, одни из которых используются при симбиозе, а другие — в свободноживущем состоянии.

Полученные результаты расширяют наши знания о сложной системе контроля СЭ со стороны клубеньковых бактерий. Этот контроль может быть связан с биохимическими функциями, которые необходимы для развития ризобий *ex planta*, однако ограничивают формирование высокопродуктивного азотфиксирующего симбиоза. Модификация этой системы является важным резервом направленного конструирования хозяйственно-ценных штаммов клубеньковых бактерий.

Работа поддержана грантами РФФИ (08-04-01230-а, 12-04-00409 а) и выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» отделения земледелия Российской академии сельскохозяйственных наук Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии» в рамках госконтракта № 16.552.11.7085.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ибрагимова М. В., Румянцева М. Л., Онищук О. П. с соавт. (2006). Симбиоз клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti* с люцерной *Medicago sativa* в условиях засоления. *Микробиология*. Т. 75 (1): С. 94–100.
2. Кожемяков А. П., Тихонович И. А. (1998). Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве. *Докл. РАСХН*. № 6: С. 7–10.
3. Лакин Г. Ф. (1990). *Биометрия* (4-е издание). М.: Высш. школа.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984). *Методы геной инженерии*. Пер. с англ. М.: Мир.
5. Онищук О. П., Курчак О. Н., Шарыпова Л. А. с соавт. (2001). Анализ различных типов конкурентоспособности у Tп5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*). *Генетика*. Т. 37 (9): С. 1–6.
6. Онищук О. П., Шарыпова Л. А., Курчак О. Н. с соавт. (2005). Выявление генов *Sinorhizobium meliloti*, влияющих на синтез поверхностных полисахаридов и конкурентоспособность. *Генетика*. Т. 41 (12): С. 1617–1623.
7. Проворов Н. А., Воробьев Н. И. (2012). *Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза*. Под ред. И. А. Тихонович. СПб.: Информ-Навигатор.
8. Проворов Н. А., Жуков В. А., Курчак О. Н. с соавт. (2013). Совместная миграция клубеньковых бак-

- терий и бобовых растений в новые местообитания: механизмы коэволюции и практическое значение (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. Т. 49 (3): С. 229–235.
9. Федоров С. Н., Симаров Б. В. (1987). Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у *Rhizobium meliloti* под действием УФ-лучей. *С.-х. биология*. № 9: С. 44–49.
 10. Чижевская Е. П., Крель Е. А., Онищук О. П. с соавт. (1998). Физическое и генетическое картирование мутаций симбиотической эффективности на мегаплазмиде-2 штамма CXM1 *Rhizobium meliloti*. *Генетика*. Т. 34 (9): С. 1220–1227.
 11. Чижевская Е. П., Онищук О. П., Андронов Е. Е., Симаров Б. В. (2011). Использование метода сайт-направленного мутагенеза для изучения функций гена Smb20332 у клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti*. *С.-х. биология*. № 3: С. 55–60.
 12. Юргель С. Н., Шарыпова Л. А., Симаров Б. В. (1998). Tn5-мутации *Rhizobium meliloti*, вызывающие повышение редокс-потенциала свободноживущих клеток и эффективности их симбиоза с люцерной. *Генетика*. Т. 34 (6): С. 737–741.
 13. Barnet M. J., Fisher R. F., Jones T. et al. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9883–9888.
 14. Beringer J. E. (1974). R1 transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* V. 84: P. 188–198.
 15. Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J. et al. (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9877–9882.
 16. Finan T. M., Kunkel B., De Vos G. F. et al. (1986). Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* V. 167 (1): P. 66–72.
 17. Finan T. M., Weidner S., Wong K. et al. (2001). The complete sequence of the 1,638-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9889–9894.
 18. Meade H. M., Long S. R., Ruvkun G. B. et al. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* V. 149 (1): P. 114–122.
 19. Olah B., Kiss E., Györgyfal Z. et al. (2001). Mutation in the *ntr* gene, a member of the *vap* gene family, increase the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*. *MPMI.* V. 14 (7): P. 887–894.
 20. Pobigailo N., Szymczak S., Nattkemper T. W., Becker A. (2008). Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *MPMI.* V. 21 (2): P. 219–231.
 21. Sharypova L. A., Onischchuk O. P., Chesnokova O. N., et al. (1994). Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness. *Microbiology.* V. 140: P. 463–470.
 22. Sharypova L. A., Pretorius-Guth I.-M., Simarov B. V., Puhler A. (1992). Genetic improvement of *Rhizobium* strains. In: G. F. Hong (Ed.). *The nitrogen fixation and its research in China*. Berlin: Springer-Verlag. P. 266–285.
 23. Sharypova L. A., Simarov B. V. (1995). Identification of genes affecting symbiotic effectiveness of *Rhizobium meliloti*. In: I. A. Tichonovich et al. (Eds.). *Nitrogen fixation: Fundamental and applications*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. P. 371–376.
 24. Sharypova L. A., Yurgel S. N., Keller M. et al. (1999). The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglucanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Molec. Gen. Genet.* V. 261: P. 1032–1044.
 25. Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983) Vector plasmids for *in vitro* manipulations of gram-negative bacteria. In: A. Pühler, editor. *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg: P. 98–106.

IDENTIFICATION OF NEW GENES OF NODULE BACTERIA *SINORHIZOBIUM MELILOTI* INVOLVED IN THE CONTROL OF EFFICIENCY OF SYMBIOSIS WITH ALFALFA *MEDICAGO SATIVA*

Onishchuk O. P., Chizhevskaya E. P., Kurchak O. N., Andronov E. E., Simarov B. V.

✉ **SUMMARY:** *Background.* Alfalfa root nodule bacteria (*Sinorhizobium meliloti*) are among the most active symbiotic N₂-fixers. Their symbiotic efficiency (SE) defined as an ability to enhance the productivity of inoculated host plants is the polygenic trait controlled by a complicated system of genes, inactivation of which can result in either decrease or increase of SE. Analysis of previously identified *eff*-genes, whose mutations result in SE increase, revealed their location in different parts of genome (chromosome or megaplasmids) and demonstrated that these genes are not involved in operation of nitrogenase system. Mutations in these genes have pleiotropic effects, changing various cultural-biochemical properties of bacteria. *Materials and methods.* The object of research were the laboratory *S. meliloti* strain CXM1-105 and its Tn5-mutants with Eif⁺⁺ phenotype, which are able to grow in diagnostic media containing indicator of cell redox potential TTC, herbicide 2M-4XM or the Congo Red dye. New *eff*-genes were identified using the modified method of “inverted” PCR. *Results.* We obtained three Tn5 mutants with an increased SE in which the symbiotic phenotypes are dependent on the host. Two-factor analysis of variance demonstrated that the genotypic difference between mutants is most pronounced under the salt stress, while in its absence SE is determined mostly by the host genotype. Mo-

lecular-biological analysis revealed that the T4 mutant harbours the Tn5 insertion in the *mtaD* gene, T795 — in the *thiC* gene, and M3 — in the gene which encodes a protein belonging to the GntR family of transcription regulators. **Conclusion.** We demonstrated firstly that mutations in genes involved in transcription regulation, phosphonate metabolism and thiamine biosynthesis may result in a SE increase. The “inverted” PCR method enabled us to rapidly extract DNA fragments flanking the transposon, which suggests applicability of this method for identification of new rhizobia genes marked by Tn5.

✿ **KEY WORDS:** *Sinorhizobium meliloti*; symbiotic efficiency; competitiveness; alfalfa; genotypic interactions between symbiotic partners; salt stress, method of “inverted” PCR.

✿ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Barnet M. J., Fisher R. F., Jones T. et al. (2001). *Proc. Natl. Academy. Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9883–9888.
2. Beringer J. E. (1974) *Journal Gen. Microbiol.* V. 84: P. 188–198.
3. Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J. et al. (2001). *Proc. Natl. Academy Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9877–9882.
4. Chizhevskaya E. P., Krol E. A., Onishchuk O. P. et al. (1998). *Fizicheskoe i geneticheskoe kartirovanie mutacij simbioticheskoy jeffektivnosti na megaplazmide-2 shtamma CHM1 Rhizobium meliloti*. [Physical and genetic mapping of mutations for symbiotic effectiveness on megaplasmid-2 of the *Rhizobium meliloti* strain CXM1]. *Rus. J. Genetiks.* V. 34 (9): P. 1027–1033.
5. Chizhevskaya E. P., Onishchuk O. P., Andronov E. E., Simarov B. V. (2011). *Ispol'zovanie metoda saj-t-napravlennoogo mutageneza dlja izuchenija funkcij gena SMb20332 u kluben'kovyh bakterij Sinorhizobium meliloti* [Use of site-directed mutagenesis to study the functions of gene SMb20332 in the nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*]. *S.-h. biologija.* V. 3: P. 55–60.
6. Fedorov S. N., Simarov B. V. (1987). *Poluchenie mutantov s izmenennymi simbioticheskimi svojstvami u Rhizobium meliloti pod dejstviem UF-luchej* [Isolation of mutants with altered symbiotic properties in *Rhizobium meliloti* by the use of UV-light]. *S.-h. biologija.* V. 9: P. 44–49.
7. Finan T. M., Kunkel B., De Vos G. F. et al. (1986). *J. Bacteriol.* V. 167 (1): P. 66–72.
8. Finan T. M., Weidner S., Wong K. et al. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 98 (17): P. 9889–9894.
9. Ibragimova M. V., Rumyantseva M. L., Onishchuk O. P. et al. (2006) *Simbioz kluben'kovyh bakterij Sinorhizobium meliloti s ljucernoju Medicago sativa v uslovijah zasolenija* [Symbiosis between the nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa *Medicago sativa* under salinization conditions]. *Mikrobiologija.* V. 75 (1): P. 94–100.
10. Kozhemjakov A. P., Tichonovich I. A. (1998). *Ispol'zovanie inokuljantov bobovyh i biopreparatov kompleksnogo dejstviya v sel'skom hozjajstve* [Application of legume inoculants and biopreparations of complex action in agriculture]. *Dokl. RASHN.* V. 6: P. 7–10.
11. Lakin G. F. (1990). **Biometrija. [Biometrics]** (4-e izdanie). M. Vyssh. shkola.
12. Maniatis T., Fritsch J., Sambrook D. (1984). **Metody gennoj inzhenerii. Molekuljarnoe klonirovanie [Methods of genetic engineering and molecular cloning]**: Per. s angl. -M.: Mir.
13. Meade H. M., Long S. R., Ruvkun G. B. et al. (1982) *J. Bacteriol.* V. 149 (1): P. 114–122.
14. Onishchuk O. P., Kurchak O. N., Sharypova L. A. et al. (2001). *Analiz razlichnyh tipov konkurentosposobnosti u Tn-5 mutantov kluben'kovyh bakterij ljucerny (Sinorhizobium meliloti)* [Analysis of different types of competitive capacity in the alfalfa rhizobia (*Sinorhizobium meliloti* Tn5 mutants)]. *Rus. J. Genetiks.* V. 37 (9): P. 1–6.
15. Onishchuk O. P., Sharypova L. A., Kurchak O. N. et al. (2005). *Vyjavlenie genov Sinorhizobium meliloti, vlijajushchih na sintez poverhnostnyh polisaharidov i konkurentosposobnost'* [Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes influencing synthesis of surface polysaccharides and competitiveness]. *Rus. J. Genetiks.* V. 41 (12): P. 1617–1623.
16. Pobigailo N., Szymczak S., Nattkemper T. W., Becker A. (2008). *MPMI.* V. 21 (2): P. 219–231.
17. Provorov N. A., Vorobyov N. I. (2012) *Geneticheskie osnovy jevoljucii rastitel'no-mikrobnogo simbioza*. [Genetic basis of evolution of plant-microbe symbiosis]. I. A. Tichonovich, editor, St. Petersburg: Inform-Navigator.
18. Provorov N. A., Zhukov V. A., Kurchak O. N. et al. (2013). *Sovmestnaja migracija kluben'kovyh bakterij i bobovyh rastenij v novye mestoobitanija: mehanizmy kojevoljucii i prakticheskoe znachenie (obzor)*. [Comigration of root nodule bacteria and bean plants to new habitats: coevolution mechanisms and practical importance (review)]. *Prikladnaja biokhimiya i mikrobiologija.* V. 49 (3): P. 229–235.
19. Sharypova L. A., Onishchuk O. P., Chesnokova O. N. et al. (1994). *Microbiology.* V. 140: P. 463–470.
20. Sharypova L. A., Pretorius-Guth I.-M., Simarov B. V., Puhler A. (1992). In: G. F. Hong, editor. *The nitrogen fixation and its research in China*. Berlin: Springer-Verlag. P. 266–285.
21. Sharypova L. A., Simarov B. V. (1995). In: I. A. Tichonovich et al., editors. *Nitrogen fixation: Fundamental and applications*. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. P. 371–376.
22. Sharypova L. A., Yurgel S. N., Keller M. et al. (1999). *Molec. Gen. Genet.* V. 261: P. 1032–1044.

23. Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983). In: A. Pühler, editor. *Molecular genetics of the Bacteria-Plant interaction*. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg: P. 98–106.
24. Yurgel S. N., Sharypova L. A., Simarov B. V. (1998). *Tn5-mutacii Rhizobium meliloti, vyzyvajushhie povyshenie redoks-potenciala svobodno-zhivushhikh kletok i jeffektivnosti ih simbioza s ljucernoju*. [Mutations Tn5 of *Rhizobium meliloti* enhancing the redox potential of free-living cells and effectiveness of their symbiosis with alfalfa]. *Rus. J. Genetiks.* V. 34 (6): P. 737–741.

✉ Информация об авторах

Онищук Ольга Петровна — к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики и селекции микроорганизмов. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Шоссе Подбельского, д. 3. E-mail: olony@yandex.ru.

Курчак Оксана Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории генетики и селекции микроорганизмов. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Шоссе Подбельского, д. 3. E-mail: genet@yandex.ru.

Чижевская Елена Петровна — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории генетики и селекции микроорганизмов. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Шоссе Подбельского, д. 3. E-mail: genet@yandex.ru.

Андронов Евгений Евгеньевич — к. б. н., заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Шоссе Подбельского, д. 3. E-mail: eeandr@yandex.ru.

Симаров Борис Васильевич — д. б. н., заведующий лабораторией генетики и селекции микроорганизмов. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии. 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, Шоссе Подбельского, д. 3. E-mail: genet@yandex.ru.

Onishchuk Olga Petrovna — PhD, Senior scientists of the laboratory of genetic and selection of microorganisms. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. 196608, St. Petersburg, Pushkin 8, Podbelsky Chaussee 3, Russia. E-mail: olony@yandex.ru.

Kurchak Oksana Nikolayevna — PhD, Senior scientists of the laboratory of genetic and selection of microorganisms. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. 196608, St. Petersburg, Pushkin 8, Podbelsky Chaussee 3, Russia. E-mail: genet@yandex.ru.

Chizhevskaya Elena Petrovna — PhD, Senior scientists of the laboratory of genetic and selection of microorganisms. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. 196608, St. Petersburg, Pushkin 8, Podbelsky Chaussee 3, Russia. E-mail: genet@yandex.ru.

Andronov Evgeniy Yevgenyevich — PhD, Head of the laboratory of microbiological monitoring and bioremediation of soils. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. 196608, St. Petersburg, Pushkin 8, Podbelsky Chaussee 3, Russia. E-mail: eeandr@yandex.ru.

Simarov Boris Vasilyevich — Dr. Sci., Head of the laboratory of genetic and selection of microorganisms. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. 196608, St. Petersburg, Pushkin 8, Podbelsky Chaussee 3, Russia. E-mail: genet@yandex.ru.