

УДК 576.871.155.557

БИОТЕХНОЛОГИЯ ОТРИМАННЯ АКТИВНИХ Tn5-МУТАНТІВ *RHIZOBIUM GALEGAE*

Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ, Л.А. КУДРЯВЧЕНКО, П.П. ПУХТАЄВИЧ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: n-vorobey@ukr.net*

За допомогою плазмідного вектора pSUP5011::Tn5mob проведено мутагенез штамів *Rhizobium galegae* 159, 0702, 0703. Частота появи стійких до канаміцину мутантів при перенесенні цього вектора з *Escherichia coli* в *Rhizobium galegae* становила $(1,3-1,9) \cdot 10^{-7}$. У результаті селекції Tn5-мутантів *R. galegae* за ознаками «вірулентність», «азотфіксація», «ефективність симбіозу» відібрано генетично марковані ризобії з поліпшеними властивостями. Отримані дані вказують на можливість створення ефективних симбіотичних систем *Galega orientalis* L.—Tn5-мутанти *R. galegae*.

Ключові слова: *Rhizobium galegae*, *Galega orientalis* L. (козлятник), симбіоз, азотфіксація, бульбочкові бактерії, транспозонний мутагенез.

Світові наукові розробки свідчать про перевагу використання мікроорганізмів-азотфіксаторів для поліпшення азотного живлення рослин шляхом біологічного перетворення молекулярного азоту на органічні азотвмісні сполуки. Інтенсивність процесу симбіотичної фіксації атмосферного азоту визначається комплементарністю та взаємодією макро- і мікросимбіонтів, їх толерантністю до чинників навколишнього середовища [12, 13].

Козлятник східний — бобова культура, яка дедалі більше поширюється у сільськогосподарському виробництві України [3, 4]. Використання цього виду рослин зумовлене його господарсько-цінними ознаками: морозостійкістю, інтенсивним ростом, раннім весняним відростанням надземної маси, можливістю вирощування на одному місці протягом 10—12 років, переважанням симбіотрофного живлення над автотрофним, що забезпечує отримання високоякісного корму без внесення азотних добрив за рахунок симбіотичної азотфіксації [2, 5]. Оскільки козлятник східний — культура нова, в ґрунтах відсутні або малопоширені активні специфічні для нього штами бульбочкових бактерій. Це потребує штучної інокуляції козлятника біопрепаратами на основі активних штамів *Rhizobium galegae*, спектр яких на сьогодні доволі обмежений. Застосування таких препаратів у технології вирощування козлятнику східного сприятиме підвищенню симбіотичного потенціалу рослин, зростанню врожайності культури, зниженню чутливості до несприятливих ґрунтово-кліматичних умов [5].

На сучасному етапі разом із традиційними методами селекції застосовують нові біотехнологічні підходи з використанням транспозонів для трансформації геному бактерій, що є ефективним і перспективним

засобом отримання штамів із поліпшеними симбіотичними властивостями [6]. Використання для інокуляції насіння бобових культур нових високоефективних штамів, створених біотехнологічними методами, дає не лише симбіотичні системи з високим рівнем фіксації атмосферного азоту, а й підвищує стійкість рослин до дії стресових чинників довкілля, що, у свою чергу, гарантує отримання високих і стабільних урожаїв, зокрема за несприятливих умов вирощування.

Для мутагенезу мікроорганізмів розроблено низку експериментальних систем, які використовують різні транспозони. Найбільш вдалою для бульбочкових бактерій є система на основі транспозону Tn5 [16, 17], що зумовлено високою частотою інтеграції транспозону в геноми реципієнтних штамів мікроорганізмів, відсутністю специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК при транспозиції Tn5 і вкрай низькою частотою утворення ревертантів. Транспозоновий мутагенез застосовано до бульбочкових бактерій *B. japonicum*, *R. tropici*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *S. meliloti*, *R. trifolii*, *R. fredii*, *R. sp.*, *R. loti*, *R. parasponia* та інших бактерій-азотфіксаторів [1, 8, 11, 15, 17].

Метою цього дослідження було отримання нових активних форм бульбочкових бактерій козлятнику за використання плазміди pSUP5011::Tn5mob для подальшої селекції, спрямованої на добір ризобій, стійких до несприятливих чинників довкілля, і забезпечення ефективної азотфіксації симбіотичними системами *Galega orientalis* L.—*Rhizobium galegae*.

Методика

Генетичною базою при доборі реципієнтів слугували штами бульбочкових бактерій козлятнику — *Rhizobium galegae* 0702, 0703, 159, Л2, К15 із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРГ) НАН України. Донором Tn5 був штам кишкової палички *Escherichia coli* S17-1 з плазмідним вектором pSUP5011::Tn5mob [16, 17]. У роботі використано антибіотики стрептоміцину сульфат (Str) і канаміцин (Km), які належать до класу аміноглікозидів, добре розчинні у воді й погано розчинні в ліпідах [7], у граничних концентраціях, мкг/мл: Str — 25—600, Km — 25—200. Для відновлення фізіологічної активності бактеріальних культур [10] бульбочкові бактерії *R. galegae* вирощували на синтетичному середовищі 79 [14] за температури 28 °С протягом 3—4 діб, бактерії кишкової палички *E. coli* S17-1 — на середовищі LB [9] за 37 °С упродовж 1 доби. Tn5-мутагенез бульбочкових бактерій здійснювали на середовищі TY [9]. Життєздатність та інтенсивність росту (розмноження) бактерій визначали методом граничних розбавлень і підрахунку колоній [10]. Облік колоній, які утворились на агаризованому середовищі 79 у чашках Петрі (повторність триразова), проводили на 5-ту добу інкубації в термостаті.

Спектр залучених штамів бульбочкових бактерій до транспозонового мутагенезу обмежується особливостями використаного плазмідного вектора. Штам *E. coli* S17-1 (pSUP5011::Tn5mob) (донор плазмідного вектора) має фактори стійкості до низки антибіотиків, у тому числі й до канаміцину (200 мкг/мл), яку кодує транспозон Tn5. Мутантні клітини ризобій, які внаслідок кон'югації «поглинуть» транспозон Tn5, відбирають від батьківських штамів-реципієнтів *R. galegae* за набутою резистентністю до 200 мкг/мл канаміцину, а від клітин штаму-донора (*E. coli*) — за

стійкістю до стрептоміцину, тому штами-реципієнти мають бути чутливими до низької концентрації канаміцину і мати високу резистентність до стрептоміцину.

Транспозон до клітин бульбочкових бактерій вводили за методикою, описаною в працях [16, 17] і частково нами модифікованою. Бактерії донора й реципієнтів вирощували до пізньої лаг-фази на агаризованих середовищах. Для *E. coli* (донор) — це нічна культура, для *R. galegae* (реципієнт) — тридобова. Бактерії змішували у співвідношенні 1 : 5 (приблизно одна мікробіологічна петля ризобій і п'ять *E. coli*) у 0,5 мл стерильної води і переносили на агаризоване середовище ТУ без антибіотика. Засіяні бактеріями чашки вміщували в термостат на 6 і 18 год. Після експозиції кон'югаційну суміш бактерій змивали стерильною водою (5 мл) з поверхні агару в пробірку й суспендували. Із суспензії (нульове розбавлення) готували послідовні 10-, 100- і т. д. кратні розбавлення й висівали на селективні середовища. Мутантні клітини ризобій відбирали на середовищі ТУ + 200 Km + 500 Str (мкг/мл), на яке висівали по 0,1 або 0,2 мл кон'югаційної суміші. Колонії бульбочкових бактерій, які вирости на селективному середовищі ТУ + Km + Str, переносили на середовище 79 + 200 мкг/мл Km для подальших досліджень.

Загальну кількість життєздатних клітин ризобій у кон'югаційній суміші (як отриманих транспозантів, так і клітин, що не вступили в кон'югацію) визначали за КУО (колонієутворювальні одиниці) на середовищі 79 + 500 мкг/мл Str. На селективне середовище висівали суміші 6-, 7-, 8-го розбавлень. Частоту транспозиції V визначали за співвідношенням

$$V = \frac{\text{Кількість клітин у «0»-розбавленні, які вирости на середовищі 79+Km+Str}}{\text{Кількість клітин у «x»-розбавленні, які вирости на середовищі 79+Str}}$$

Первинний добір Tn5-мутантів *Rhizobium galegae* за симбіотичними показниками проводили в умовах дрібноділянкового дослідю. Бактеризоване насіння козлятнику сорту Гале (сорт створений в Естонському НДІ землеробства і меліорації) висівали в рядки завдовжки 1 м. Один рядок відповідав певному варіанту дослідю. Через кожні 10 рядків висівали контролю — насіння козлятнику, інокульоване вихідними (батьківськими) штамми *R. galegae* 159 та 0703. Глибина загортання насіння — 3–5 см, ширина міжрядь — 25 см. Первинний відбір рослин козлятнику проводили у фазу початку стеблуння. Визначали азотфіксувальну активність, кількість та масу бульбочок, вегетативну масу рослин. Експериментальні дані оброблено статистично з використанням методів статистичного аналізу за програмою Microsoft Excel 2010.

Результати та обговорення

Штам кишкової палички *E. coli* S17-1 (pSUP5011::Tn5mob) має генетично детерміновані маркери стійкості до антибіотиків Str і Km. Оскільки культура тривалий час зберігалась в умовах музейної колекції, було відновлено її фізіологічну активність та оцінено резистентність до Str і Km [10]. Встановлено, що бактерії *E. coli* S17-1 (pSUP5011::Tn5mob) резистентні до 50 мкг/мл Str і 200 мкг/мл Km, що свідчить про наявність у геномі клітин кишкової палички гена неоміцинтрансферази транспозону Tn5.

Серед штамів бульбочкових бактерій *Rhizobium galegae* обрано штами-реципієнти. У результаті дослідження встановлено, що штами

ТАБЛИЦЯ 1. Резистентність штамів бульбочкових бактерій *Rhizobium galegae* до різних концентрацій стрептоміцину

Штам	Середовище 79 б/а	Концентрація стрептоміцину, мкг/мл							
		25	50	100	150	200	300	500	600
0703	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
0702	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+—	—
159	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+—	—
Л2	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
К15	+++	+++	+++	+++	+++	+—	—	—	—

П р и м і т к а. Характер росту ризобій: «+++» — на рівні контролю; «++» — дуже слабкий; «+—» — ледве помітний; «—» — відсутній; тут і в табл. 2: б/а — без антибіотика.

R. galegae 0702, 0703 і 159 резистентні до 300 мкг/мл і чутливі до 500 мкг/л Str (табл. 1). Проте на середовищі 79 + 400 мкг/л Str із часом утворились колонії, що свідчило про гетерогенність популяції та наявність клітин із більшою резистентністю до Str, що в подальшому сприяло адаптації і ступінчастому відбору бульбочкових бактерій *R. galegae* за цим показником на середовищах із вищим вмістом Str. У результаті отримано клони штамів 159, 0702 і 0703 *R. galegae*, стійкі до 450—600 мкг/мл Str.

Слід зазначити, що стрептоміцин належить до класу антибіотиків, які пригнічують синтез білка в клітині (порушує функціонування 30S-субчастин рибосом, що призводить до включення помилкових амінокислот до поліпептидного ланцюга, що росте) [7]. Механізм стійкості бактерій до антибіотика полягає в його ферментативній інактивації внаслідок аденілування чи фосфорилювання гідроксильної групи в положенні 3-метилглюкозаміну і визначається трансмісивним R-фактором [7].

У результаті вивчення стійкості ризобій до Km встановлено, що в дозах 30 і 50 мкг/мл антибіотик пригнічував репродукцію клітин штамів 0702, 0703 та 159 *R. galegae* (табл. 2). Оскільки кількість КУО зменшилася в 1,5—2 рази порівняно з аналогічним показником на середовищі без антибіотика, для штамів 0702 і 159 доза 30 мкг/л Km виявилась мінімально пригнічувальною. Канаміцин у дозі 75 мкг/л спричинював бактеріцидний ефект (відсутність росту клітин штамів 0702 і 159 *R. galegae*).

Репродукція клітин штамів Л2 і К15 *R. galegae* на середовищі 79 + 100 мкг/л Km свідчить про високу резистентність культур і обмежує їх використання як реципієнтів за Tn5-мутагенезу (див. табл. 2).

Оскільки штам-донор має фактори стійкості до низки антибіотиків, у тому числі й до високої концентрації канаміцину, яку кодує транспозон Tn5, за реципієнтів були обрані штами бульбочкових бактерій козлятника, чутливі до низької концентрації Km і резистентні до вищих концентрацій Str порівняно з генетично кодованою стійкістю до стрептоміцину *E. coli* S17-1. Отже, серед штамів бульбочкових бактерій козлятника відібрані 0702, 0703 та 159 *R. galegae*, чутливі до 60—75 мкг/л Km і резистентні до 450—600 мкг/л Str (див. табл. 1, 2).

Тривалість генерації (подвоєння) клітин швидкорослих ризобій становить 4 год, тому було обрано тривалість інкубації кон'югаційної суміші *R. galegae* + *E. coli* 6 год (з урахуванням часу подвоєння клітин швидкорослих ризобій) і 18 год (на основі методики Новікової) [11].

Згідно з отриманими результатами транспозонового мутагенезу бульбочкових бактерій *R. galegae*, частота транспозиції варіювала за-

ТАБЛИЦЯ 2. Кількість (КУО · 10⁹) бульбочкових бактерій *Rhizobium galegae* на мінеральному середовищі з канаміцином

Штам	Середовище 79 б/а	Концентрація канаміцину, мкг/мл					
		25	30	50	75	100	150
0702	318,5±20,5	250,5±15,5	165,0±8,5	89,5±5,5	0	0	0
0703	2100±30,4	1414,5±54,5	298,0±24,5	88,0±5,4	12,5±0,50	0	0
159	2427±50,1	1186,3±70,0	656,5±25,6	496,5±32,5	0	0	0
Л2	1536±45,4	1344,4±46,8	1105,4±67,5	850,0±70,0	187,2±15,5	52,0±2,5	0
К15	2412±36,8	1862,5±47,5	1780,5±45,5	1400,5±25,5	1321,4±50,4	870,0±45,8	0

лежно від плазмідного вектора, штаму бульбочкових бактерій і часу інкубації кон'югаційної суміші донора з реципієнтом. Унаслідок Tn5-мутагенезу *R. galegae* 159 за інкубації суміші *R. galegae* 159 × *E. coli* pSUP5011::Tn5mob протягом 6 год частота транспозиції (частота появи канаміциностійких (Km^r) клітин ризобій) була низькою і становила 4,4 · 10⁻⁸. З подовженням часу інкубування кон'югаційної суміші до 18 год частота транспозиції досягала 1,6 · 10⁻⁷ (табл. 3). Іноді отримані клони Km^r клітин ризобій штаму *R. galegae* 159 з часом втрачали стабільність, про що свідчила відсутність росту клітин на селективному середовищі 79 + 200 мкг/мл Km.

Ефективнішим виявилось застосування Tn5-мутагенезу до бактерій штаму *R. galegae* 0703. Частота транспозицій становила відповідно 1,9 · 10⁻⁷ та 1,3 · 10⁻⁷ за 6- і 18-годинної експозиції кон'югаційної суміші, що засвідчило здатність вектора pSUP5011::Tn5mob вбудовуватись у клітини ризобій штаму 0703 з достовірною частотою транспозицій. Ріст Km^r-клонів клітин штаму 0703 на середовищі 79 + 200 мкг/мл Km підтвердив, що вони є Tn5-мутантами батьківського штаму.

У результаті транспозонового мутагенезу штамів *R. galegae* 159 і 0703 за використання pSUP5011::Tn5mob отримано відповідно 56 і 230 канаміциностійких клонів клітин бульбочкових бактерій козлятинику (див. табл. 3). Мутагенез штаму *R. galegae* 0702 векторною плазмідною pSUP5011::Tn5mob є неефективним, оскільки частота транспозицій була низькою і стабільні канаміциностійкі клони клітин ризобій не утворювались незалежно від тривалості інкубації.

Наступним етапом нашої роботи був скринінг за симбіотичними показниками Km^r-мутантів (pSUP5011::Tn5mob) штамів *R. galegae* 159 та 0703. Проаналізовано 10 і 30 Tn5-мутантів відповідно штамів *R. galegae* 0703 та 159. Виявлено, що рослини, інокульовані Tn5-мутантами, відрізнялись за кількістю й масою бульбочок та їх розміщенням на кореневій системі і, як наслідок, за активністю азотфіксації.

У результаті застосування Tn5-мутагенезу отримано мутанти як із низькими, так і поліпшеними симбіотичними властивостями (табл. 4). Оскільки метою наших досліджень був добір мікросимбіонтів із підвищеними симбіотичними ознаками, ми селекціонували мутанти, які переважали батьківські (вихідні) штами (контроль) більш як на 10 % за одним або кількома симбіотичними показниками (табл. 5). З-поміж Tn5-мутантів штаму *R. galegae* 159 найбільшу кількість бульбочок на коренях козлятинику індукували К33, К44, К56 та К60 (зазначений показник був вищим на 12,6—44,7 % порівняно з батьківським штамом). На ко-

ТАБЛИЦЯ 3. Тп5-мутанезис бульбачкових бактерій *Klebsiella galegae* за використання як штаму-донора *E. coli* S17-1 (*pSUP5011::Tn5mob*)

Штам-реципієнт	Характеристика штаму	Чутливість до Кп, мкг/мл	Спійкість до Str, мкг/мл		t, год	Кількість Кп ^r -клітин на МДА+Кп+Str	Загальна кількість клітин на МДА+Str	Частота виникнення мутантів Кп ^r -	Кількість отриманих мутантів Кп ^r -		
			природна	набута						Розбавляння	
										Вихідне (0)	x (7)
159	Активний, вірулентний	60	450	500	6	2	4,5±0,5	4,4·10 ⁻⁸	8		
0702	Активний, вірулентний	60	450	500	18	16	9,8±0,5	1,6·10 ⁻⁷	48		
0703	Активний, вірулентний	75	300	450	6	2	51,9±3,5	3,8·10 ⁻⁹	0		
0703	Активний, вірулентний	75	300	450	18	3	66,0±4,0	4,5·10 ⁻⁹	0		
0703	Активний, вірулентний	75	300	600	6	53	28,0±3,0	1,9·10 ⁻⁷	105		
0703	Активний, вірулентний	75	300	600	18	72	54,8±3,5	1,3·10 ⁻⁷	125		

Примітка: t — час експозиції зі штамом-донором. МДА — манітно-дріжджовий агар.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ Tn-МУТАНТОВ

ТАБЛИЦЯ 4. Симбіотичні показники бульбочкових бактерій *Rhizobium galegae* у симбіозі з рослинами козлятнику сорту Гале (на одну рослину)

Штам, Tn5-мутант	Кількість бульбочок, шт.	Маса бульбочок, мг	Азотфіксувальна активність, мкм C ₂ H ₄ /(рослину·год)	Надземна маса, г
Tn5-мутанти (pSUP5011::Tn5mob) <i>Rhizobium galegae</i> 159				
<i>R. galegae</i> 159 (вихідний штам)	24,5±0,2	56,0±0,63	0,38±0,062	2,24±0,30
K33	28,5±0,01	84,0±12,3	0,45±0,0032	1,85±0,97
K35	24,2±0,08	82,0±11,3	0,53±0,002	2,35±0,26
K38	26,2±6,5	91,0±8,4	0,84±0,03	2,63±0,29
K44	35,0±6,0	75,0±5,7	0,75±0,04	2,48±0,39
K50	21,2±1,9	65,0±4,0	0,46±0,02	2,62±0,38
K53	20,7±0,8	77,0±0,12	0,70±0,005	2,65±0,12
K56	27,6±0,2	58,0±1,9	0,48±0,032	2,61±0,23
K60	37,0±1,7	65,0±2,0	0,61±0,041	2,48±0,17
Tn5-мутанти (pSUP5011::Tn5mob) <i>Rhizobium galegae</i> 0703				
<i>R. galegae</i> 0703 (вихідний штам)	21,0±0,12	54,0±1,3	0,64±0,01	1,76±0,12
K124	27,2±1,3	66,0±5,4	1,16±0,12	1,95±0,27
K125	30,4±0,9	73,0±1,0	0,82±0,02	2,03±0,21
K127	18,0±0,5	65,0±2,5	0,80±0,03	1,95±0,15
K129	24,5±0,2	67,0±2,5	0,79±0,20	2,02±0,31

ТАБЛИЦЯ 5. Симбіотичні показники бобово-ризобіальних систем козлятнику східного сорту Гале за участю Tn5-мутантів штаму *R. galegae*

Варіант	Симбіотичні показники, ± % до вихідного штаму <i>R. galegae</i>			
	Вірулентність (середня кількість бульбочок на рослині)	Нодуляція (маса бульбочок)	Азотфіксація (відновлення ацетилену до етилену)	Ефективність (надземна маса)
<i>R. galegae</i> 159	100,0	100,0	100,0	100,0
Tn5-мутант				
K33	+16,32	+50,0	+18,4	-17,42
K35	-1,3	+46,4	+39,47	+4,91
K38	+6,93	+62,5	+121,05	+17,91
K44	+42,85	+33,9	+97,36	+10,71
K50	-13,47	+16,0	+21,05	+16,96
K53	-15,52	+37,5	+84,21	+18,30
K56	+12,65	+3,57	+26,31	+16,51
K60	+51,02	+16,0	+60,52	+10,71
<i>R. galegae</i> 0703	100,0	100,0	100,0	100,0
Tn5-мутант				
K124	+29,52	+22,2	+81,25	+10,79

ренях рослин, інокульованих мутантами K124, K125, K129 штаму *R. galegae* 0703, кількість бульбочок зросла на 16,5—50,0 % відносно контролю. 13 із 40 досліджених Tn5-мутантів *R. galegae* у симбіозі з козлятником східним формували бульбочки, азотфіксувальна активність яких переважала активність бульбочок вихідних штамів у 1,8—2,2 раза. Найінтенсивніше фіксували кореневі бульбочки рослин, інокульованих Tn5-мутантами K38, K44, K53, K124. Інтенсифікація біологічної азотфіксації у симбіотичних системах козлятник східний—Tn5-мутанти забезпечувалась підвищеною активністю ферментативного нітрогеназного комплексу ризобій і більшою (на 16,0—62,5 %) масою корневих бульбочок порівняно з відповідним показником у контрольних рослин.

Слід зазначити, що на початкових етапах формування і функціонування симбіотичних систем досить складно відібрати «+»-варіанти, які б у подальшому характеризувались високим продукційним потенціалом. Проте оцінювання за симбіотичними показниками у ранні фази онтогенезу рослин (первинний скринінг) дає можливість виявити малоактивні мікросимбіоти і в подальшому зосередити увагу на дослідженні активних мікросимбіонтів за впливом на фенотипні господарсько-цінні ознаки рослини-хазяїна.

Зазвичай ефективність симбіозу оцінюють за урожаєм зеленої маси (або урожаєм зерна) бобових рослин, який є інтегральним показником функціонування бобово-ризобіального комплексу. Проте і в ранній період розвитку рослин (зокрема у фазу стеблуння) спостерігається відмінність за ростом і розвитком між рослинами, інокульованими різними за активністю ризобіями. Тому показник «надземна маса рослини» у цей період характеризує інтенсивність метаболічних процесів у системі рослина-хазяїн—мікросимбіонт. Зокрема у варіантах з інокуляцією козлятника відібраними активними мутантами (за винятком K33, K34) надземна маса рослин була більшою, приріст змінювався в межах 4,9—18,3 %. Біологічно зв'язаний азот, що надходить з бульбочок до кореневої системи рослини-хазяїна, поліпшує її азотне живлення, й отже, стимулює ріст і розвиток вегетативних органів (надземної маси та коренів).

У результаті вивчення отриманої нами колекції Tn5-мутантів (pSUP5011::Tn5mob) бульбочкових бактерій *R. galegae* за ознаками «вірулентність», «азотфіксація», «надземна маса рослин» відібрано 12 культур із поліпшеними симбіотичними властивостями. Встановлено, що за використання біотехнологічних методів можна отримати активні мутанти бульбочкових бактерій козлятника і створити на їх основі ефективні симбіотичні системи *Galega orientalis* L.—Tn5-мутанти *R. galegae*.

1. Воробей Н.А., Коць С.Я., Маліченко С.М., Якимчук Р.А. Дослідження симбіотичних систем сої, утворених за участю транспозантів *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — 38, № 5. — С. 418—426.
2. Воробей Ю.О., Воробей В.С., Пуріг О.В. Особливості взаємодії *Rhizobium galegae* з козлятником східним // С.-г. мікробіологія. — 2016. — Вип. 24. — С. 9—17.
3. Квітко Г.П., Ткачук О.П., Гетман Н.Я. Багаторічні бобові трави — основа природної інтенсифікації кормовиробництва та поліпшення родючості ґрунту в Лісостепу України // Корми і кормовиробництво. — 2012. — Вип. 73. — С. 118—122.
4. Кириленко Л.В., Патица В.П. Урожайність козлятника східного залежно від сортових особливостей // Вісн. Дніпроп. держ. аграр. економ. ун-ту. — 2014. — 34, № 2. — С. 107—109.
5. Кириленко Л.В., Шкатула Ю.М., Коць С.Я. та ін. Формування високоефективної симбіотичної системи *Rhizobium galegae*—козлятник // Вісн. аграрної науки. — 2014. — № 1. — С. 22—25.

6. Коць С.Я., Моргул В.В., Тихонович И.А. и др. Биологическая фиксация азота: генетика азот-фиксации, генетическая инженерия штаммов. — Киев: Логос, 2011. — Т. 3. — 404 с.
7. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики / Пер. с англ. Ю.В. Дудника. — М.: Мир, 1985. — 265 с.
8. Мандровська Н.М., Кругова О.Д., Коць С.Я. Ефективність симбіозу рослин гороху із транспозантами *R. leguminosarum* bv. *viciae* 2636 // Вісн. Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 1(10). — С. 65—70.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 395 с.
10. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Академия, 2005. — 608 с.
11. Новикова Н.И., Шарыпова Л.А., Симаров Б.В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекул. генетика, микробиология, вирусология. — 1986. — № 8. — С. 32—35.
12. Патица В.П., Гнатюк Т.Т., Булеца Н.М., Кириленко Л.В. Біологічний азот у системі землеробства // Землеробство. — 2015. — **89**, № 2. — С. 12—20.
13. Петриченко В.Ф., Квітко Г.П., Царенко М.К. Наукові основи інтенсифікації польового кормовиробництва в Україні. — Вінниця: ФОП Данилюк В.Г., 2008. — 240 с.
14. Allen O.N. Experiments in Soil Bacteriology. — Minneapolis: Burges Publishing. Co., 1959. — 59 p.
15. Marroguí S., Zorreguieta A., Santamari C. et al. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants // J. Bacteriol. — 2001. — **183**, N 3. — P. 854—864.
16. Reznikoff W.S. Transposon Tn5 // Annu. Rev. Genet. — 2008. — **42**. — P. 151—158.
17. Simon R., Connell O., Labes M., Puhler A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulations of *Rhizobium* and other gram-negative bacteria // Methods in Enzymology. — 1986. — **118**. — P. 640—659.

Отримано 06.08.2017

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ Tn5-МУТАНТОВ *RHIZOBIUM GALEGAE*

Н.А. Воробей, С.Я. Коць, Л.А. Кудрявченко, П.П. Пухтаевич

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

С помощью плазмидного вектора pSUP5011::Tn5mob проведен мутагенез штаммов *R. galegae* 159, 0702, 0703. Частота появления устойчивых к канамицину мутантов при перенесении этого вектора из *Escherichia coli* в *Rhizobium galegae* составляла $(1,3—1,9) \cdot 10^{-7}$. В результате селекции Tn5-мутантов *R. galegae* по признакам «вирулентность», «азотфиксация», «эффективность симбиоза», отобраны генетически маркированные ризобии с улучшенными свойствами. Полученные данные указывают на возможность создания эффективных симбиотических систем *Galega orientalis* L.—Tn5-мутанты *R. galegae*.

BIOTECHNOLOGY OF CREATION ACTIVE Tn5-MUTANTS OF RHIZOBIUM GALEGAE

N.A. Vorobey, S.Ya. Kots, L.A. Kudryavchenko, P.P. Pukhtayevych

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Plasmid vector pSUP5011::Tn5mob was used for transposon mutagenesis in *Rhizobium galegae* strains 159, 0702, 0703. The frequency of Km^r-mutants formation after transfer this vector from *Escherichia coli* to *Rhizobium galegae* was $(1,3—1,9) \cdot 10^{-7}$. As a result of screening Tn5-mutants of *R. galegae* on the characteristics of «virulence», «nitrogen fixation», «efficiency of symbiosis» genetically marked rhizobia with improved properties were selected. Obtained data indicate the possibility of creating highly efficient symbiotic systems *Galega orientalis* L.—Tn5-mutants *R. galegae*.

Key words: *Rhizobium galegae*, *Galega orientalis* L., symbiosis, nitrogen fixation, nodule bacteria, transposone mutagenesis.