

как в других вариантах, включая и контрольный, максимальные показатели активности клубенькообразования были получены в фазу бутонизации растений. Это может свидетельствовать о некотором замедлении процесса формирования симбиоза. Полученные в опытных вариантах данные по уровням клубенькообразования могут определяться рядом условий, которые включают симбиотические и другие свойства генетически модифицированных микроорганизмов, влияние биотических и абиотических факторов окружающей среды. Так, было показано, что инокуляция люцерны транспозоновыми мутантами *Sinorhizobium meliloti* вызывала усиление ростовой активности популяций ризосферных бактерий [3]. С другой стороны, в присутствии ризосферных микроорганизмов могут изменяться некоторые физиологические характеристики ризобий [4]. Бобово-ризобиальный симбиоз у люпина, сформированный при внесении в ризосферу растений мутантов 168-21, 168-54 и 168-57, характеризовался более высокими показателями удельной азотфиксирующей активности в фазу бутонизации по сравнению с контролем (таблица).

В фазу цветения азотфиксирующая активность клубеньков уменьшалась приблизительно в 6–10 раз, тогда как в фазу формирования бобов в ряде случаев наблюдалось незначительное усиление процессов восстановления азота. При этом наиболее существенное увеличение азотфиксации было отмечено в вариантах с использованием для инокуляции семян люпина мутантов 168-4, 168-9, 168-14. Необходимо отметить, что только мутант 168-57 способствовал увеличению массы надземной части люпина на протяжении всего периода вегетации растений (таблица). Таким образом, из всех исследуемых Tn5-мутантов штамма *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* 168 наиболее перспективными с целью дальнейшего изучения их ростстимулирующей и метаболической активности, могут быть мутанты 168-9, 168-14 и 168-57.

1. Noel K.D.R., Forsberge L.E., Carlson R.W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris* // J. Bacteriol. - 2000. - V.182, N19. - P.5317-5324.
2. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – V.43. – P.1185-1207.
3. Da H.N., Deng S.P. Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil // Appl. Soil Ecol. – 2003. – V.22, N 1. – P. 1-14.
4. Суховицкая Л.А., Мохорт Т.Г., Клышко Г.М. Выживаемость *Rhizobium* в бинарных популяциях с фосфатмобилизующими бактериями и некоторые критерии подбора ризобиально-фосфатмобилизующих композитов // Весці АН Беларусі. Сер. біял. – 1997. – №3. – С.12-16.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ (*SINORHIZOBUM MELILOTI*), ВОВЛЕЧЕННЫХ В КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА С *MEDICAGO SATIVA*

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

*ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия
genet@yandex.ru*

Клубеньковые бактерии (ризобии) – азотфиксирующие симбионты бобовых растений – играют ключевую роль в накоплении азота в природных экосистемах и агроценозах. Со стороны ризобий симбиотическая эффективность (СЭ) – способность повышать продуктивность инокулированных растений благодаря интенсивной фиксации N₂ – контролируется сложной системой генов, которая включает элементы как позитивного контроля (их инактивация в результате мутаций приводит к снижению или полной утрате СЭ), так и негативного контроля (их инактивация приводит к возрастанию СЭ). Ранее с использованием Tn5-мутагенеза в лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии у клубеньковых бактерий люцерны (*S. meliloti*) была получена серия мутантов, превышающих по СЭ эффективные исходные

штаммы СХМ1-105 и СХМ1-188 на 20-30 % [1], и для некоторых из маркированных генов (названных *eff*-генами) были определены частичные нуклеотидные последовательности [2].

В представляемой работе нами отобрано три Tn5-мутанта (Т795, М3 и Т4) у штамма СХМ1-105 *S. meliloti*, превышающих его по СЭ с люцерной *Medicago sativa* (сорт Вега) в условиях стерильного микровегетационного опыта. Мутанты превосходили родительский штамм на 23,6-33,9% по массе инокулированных растений и на 25,6-35,8% по общему накоплению в них азота (рис. 1).

Другим важным признаком симбиоза является способность штаммов конкурировать за образование клубеньков на корнях растения-хозяина. При совместной инокуляции с родительским штаммом (в соотношении 1:1) конкурентоспособность (КС) мутанта Т795 была понижена: он формировал всего 23,5% клубеньков. Мутант Т4 превышал родительский штамм по КС: он формировал 79,5% клубеньков, тогда как мутант М3 не отличался по КС от штамма СХМ1-105.

Все три мутанта отличались по ряду культурально-биохимических признаков (изученных с использованием диагностических сред) от родительского штамма (таблица).

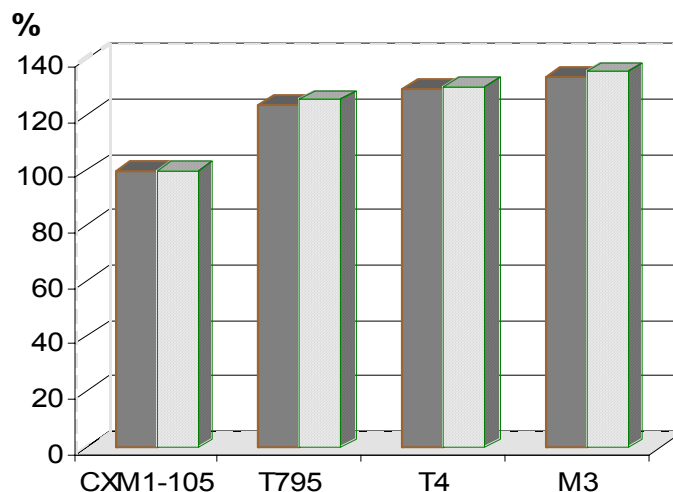


Рис. 1. Симбиотическая эффективность симбиоза Tn5-мутантов штамма СХМ1-105 *S. meliloti*. Данные представлены в процентах относительно родительского штамма; HSP_{0,05}=15% по массе растений (темные столбики), HSP_{0,05}=18% для накопления азота (заштрихованные столбики).

Таблица

Характеристика высокоэффективных мутантов *S. meliloti*

Мутант	Фенотип в симбиозе	Изменение культурально-биохимических признаков	Ген (гомолог типового штамма 1021 <i>S. meliloti</i>), функция
Т795	Eff ⁺⁺ , Cmp ⁻	образует бесслизистые колонии, изменена окраска на среде с Конго красным, нет роста на минимальной среде	SMb20615 (<i>thiC</i>), биосинтез тиамин
М3	Eff ⁺⁺ , Cmp ⁺	не окрашивается на среде N79 с трифенилтетра-золихлоридом	SMc00829, регулятор транскрипции
Т4	Eff ⁺⁺ , Cmp ⁺	чувствителен к гербициду 2М-4ХМ	SMc02421, деградация гербицидов

Примечание: Eff – симбиотическая эффективность, Cmp – конкурентоспособность.

Для выяснения возможных функций генов, маркированных Tn5, из ДНК мутантов были изолированы фрагменты, содержащие инсерцию транспозона. Секвенирование и анализ их нуклеотидных последовательностей показали, что у мутанта М3 инсерцией затронут хромосомный ген SMc00829, кодирующий один из предполагаемых регуляторов транскрипции *gntR*-семейства.

У мутанта Т4 инсерция транспозона произошла в хромосомный ген SMc02421, кодирующий фермент N-этиламмелин хлоргидролазу, который принимает участие в деградации хлор-содержащих гербицидов.

У мутанта Т795 инсерция транспозона выявлена в гене *thiC* (SMb20615), расположенном на мегаплазмиде-2 и принимающем участие в биосинтезе тиамин.

Ранее у штаммов CXM1-105 и CXM1-188 *S.meliloti* были идентифицированы *eff*-гены, контролирующие транспорт в клетку сахаров, синтез аденилатциклазы и деполимеризацию экзополисахарида-1 [3, 4]. В нашей работе было выявлено три новых гена, предположительно участвующих в контроле СЭ клубеньковых бактерий люцерны. Мутации в этих генах оказывают на бактерии плеiotропный эффект, затрагивая не только СЭ, но и некоторые культурально-биохимические признаки, которые могут быть использованы в качестве маркеров *eff*-генов при генетическом анализе СЭ. Полученные результаты существенно расширяют наши знания о системе негативного контроля СЭ со стороны клубеньковых бактерий. Дальнейшее изучение этой системы позволит перейти к направленному конструированию хозяйственно-ценных штаммов этих бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-01230-а.

1. L.A. Sharypova, O.P. Onischchuk, O.N. Chesnokova, et al.. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness // Microbiology. - 1994. - V.140 - P.463-470.
2. О.П.Онищук, О.Н.Курчак, Л.А.Шарыпова и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn-5 мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // Генетика. -2001. - Т.37. - № 9. - С.1-6.
3. L.A. Sharypova, B.V. Simarov. Identification of genes affecting symbiotic effectiveness of *Rhizobium meliloti* // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications.- Ed. Tikhonovich I.A. et al.- 1995. -Kluwer Acad. Publ. -P. 371-376.
4. L.A. Sharypova, et al. 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. -1998.- V. 261.- P. 1032-1044.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КУРИНОГО И СВИНОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО α -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

М.И. Потапович, М.В. Трубицына, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

potapovich@bsu.by

Интерфероны (ИФНы) - это большое семейство гликопротеинов, обладающих антивирусной активностью, участвующих в активации иммунной системы организма, а также в регуляции деления клеток.

Существует три основных типа интерферонов: I тип представляет собой гетерогенную группу белков, включающую ИФН-альфа (α), -бета (β), -дельта (δ), -эпсилон (ϵ), -каппа (κ), -омега (ω), -тау (τ), -зета (ζ) и др., ко II типу относится ИФН-гамма (γ). Группу интерферонов III типа образуют ИФН-лямбда1 (λ), - λ 2 и - λ 3 [1, 2]. У курицы домашней (*Gallus gallus*) идентифицировано по меньшей мере 10 генов, кодирующих α -интерфероны. Все эти гены лишены интронов и расположены на коротком плече Z-хромосомы [3]. У свиньи домашней (*Sus scrofa*) обнаружено 14 генов α -интерферонов и два псевдогена, которые расположены на первой хромосоме и тоже не имеют интронов [4].

В связи с распространением ряда высокоопасных заболеваний вирусной этиологии, таких как птичий грипп, африканская чума свиней и др., возрос интерес к лекарственным препаратам для лечения и профилактики болезней подобного рода у животных. Получение куриного и свиного лейкоцитарного α -интерферона в клетках прокариот может стать основой для создания новых лечебно-профилактических препаратов для животноводства.