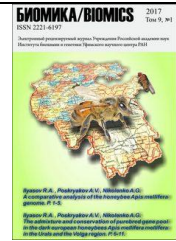




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЬЮГАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ МАРКИРОВАНИЯ ШТАММОВ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ БЕЛКАМИ.

*Гуменко Р.С., *Владиминова А.А., **Саргалиева Г.М., **Симахина А.С.,
*Зайнуллина Л.Ф., *Баймиев Ал.Х., *Баймиев Ан.Х.

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, e-mail: baymiev@anrb.ru
**Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Резюме

Клубеньковые бактерии (ризобии) - генетически разнородная группа почвенных граммотрицательных микроорганизмов, способных вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. Для данных микроорганизмов характерна высокая пластичность генома, связанная в значительной мере с горизонтальным переносом генов, в основном путем конъюгации. В данной работе предложен способ выявления конъюгативного взаимодействия между штаммами клубеньковых бактерий, основанный на их трансформации генно-инженерными конструкциями на основе мобилизуемых плазмид, несущих маркерные гены флуоресцентных белков.

Ключевые слова: конъюгация, ризобии, клубеньковые бактерии, флуоресцентные белки, горизонтальный перенос генов.

Введение

Клубеньковые бактерии (ризобии) - обширная, генетически разнородная группа почвенных граммотрицательных микроорганизмов, способных вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями с образованием специализированных структур на корнях, называемых клубеньками [Баймиев и др., 2013]. Проявляемый исследователями интерес к этим бактериям обусловлен с одной стороны, сельскохозяйственной значимостью симбиотической азотфиксации и необходимостью разработки генетических методов селекции и конструирования хозяйственно-ценных штаммов ризобий, инокуляция которыми позволит получить высокие урожаи бобовых культур без использования дорогостоящих и экологически небезопасных азотных удобрений (Симаров, 1990; Борисов и др., 2007), а с другой - использованием клубеньковых бактерий как модельного объекта для изучения биологии взаимодействия микроорганизмов с высшими растениями, генетического контроля и эволюции симбиотических систем (Онищук, 1995; Проворов, 2000; Parniske, 2008).

Известно, что для большинства видов ризобий характерно наличие составного генома, что впрочем, является типичным для α -группы протеобактерий (Jumas-Bilak et al., 1998) и подразделение генома на несколько крупных репликонов является общей чертой бактерий семейства Rhizobiaceae, кроме *Bradyrhizobium*. В архитектуре геномов ризобий отражается высокая рекомбинативная активность данных бактерий, приводящая к их высокому генетическому разнообразию. Сравнительные анализы геномов ризобий показали мозаичность их структуры: области, имеющие высокую степень сохранности синтении разделены другими последовательностями (Guo et al., 2003; Krol et al., 2007), что является доказательством динамичной структуры генома, где часто происходят рекомбинационные события, приводящие к образованию новых версий отдельных репликонов (Brom et al., 1991; Guo et al., 2003).

Геномная пластичность клубеньковых бактерий связана в значительной мере с горизонтальным переносом генов (ГПП). В.Хейманом (Heumann, 1979) было выявлено в культуре ризобий люпина («*Rhizobium lupine*»)

образование многочисленных «звездчатых» клеточных комплексов и он связал это с высокоэффективной конъюгацией, приводящей к формированию нестабильных меродиплоидов или полных диплоидов, способных к сегрегации широкого круга новых морфологических типов (Heumann, 1984). Позднее было установлено, что перенос плазмид между разными штаммами ризобий может приводить к геномным перестройкам, проявляющимся в формировании нестабильных коинтегратов и повышающим у реципиентов частоту рекомбинации, которая наиболее активна при скрещивании генетически близких штаммов.

Основным путем ГПГ у клубеньковых бактерий является конъюгация. Известно, что в плазмидах и хромосомах ризобий часто обнаруживаются сайты *oriT*, способные обеспечить высокочастотный конъюгативный перенос сцепленных с ними генов (Herrera-Carvera et al. 1998). Хотя клубеньковые бактерии обладают также системами для генетической трансформации и трансдукции (Pretorius-Guth et al. 1990), однако эффективность их невелика.

Исследование конъюгации между дикими штаммами ризобий связана с большими трудностями в связи с отсутствием удобных маркеров для отслеживания данного процесса. Нередко для этих целей используются различные генетические модификации исследуемых штаммов. Например для целей изучения переноса плазмид ризобий были использованы специально разработанные гетерологичные векторные системы, например *Tn5-mob + pRP4-4* (Simon et al., 1983).

Нами в данной работе исследован новый подход для выявления конъюгативной активности штаммов клубеньковых бактерий с использованием генноинженерных конструкций, несущих гены флуоресцентных белков.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы клубеньковых бактерий, принадлежащих к родам *Rhizobium*, выделенные из клубеньков горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.) G13 и G19.

Клубеньковые бактерии культивировали на среде JM (1% маннит, 0.05% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, 0.01% NaCl, 0.1% дрожжевой экстракт) при 28°C. В качестве селективных антибиотиков при трансформации использовали ампициллин (100 мг/мл) и гентамицин (50 мг/мл). Для маркирования штаммов флуоресцентными белками были использованы генно-инженерные конструкции *pJNTurboGFP* и *pJNTurboRFP* (Баймиев и др., 2011). Клетки трансформировали векторными

конструкциями путем электропорации на приборе MicroPulser (“Bio-Rad Laboratories”, США), с помощью предустановленной программы и протокола для трансформации агробактерий в 0.1 см электропорационной кювете. Электрокомпетентные клетки готовили согласно (Lin, 1995).

Меченые бактерии наблюдали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (“Carl Zeiss”, Германия). Для детекции GFP использовали набор светофильтров №10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565), для детекции RFP -- набор светофильтров №15 (возбуждение BP 546/12, испускание LP 590).

Для определения мобилизации маркерных плазмид штаммы клубеньковых бактерий трансформировали векторами, несущими гены разных флуоресцентных белков, и выращивали вместе в течение 2 нед на твердой питательной среде при температуре 28°C. Долю клеток клубеньковых бактерий, содержащих только GFP, только RFP, либо оба маркирующих белка одновременно, определяли на проточном цитофлуориметре NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, Inc., США). С этой целью клетки дважды промывали, а затем суспендировали в 500 мкл фосфатного буфера. Популяцию клеток разделяли по параметрам прямого (FS) и бокового (SS) светорассеивания. Флуоресценцию регистрировали на канале FITC для детекции GFP и на канале PE для RFP. Параметры напряжения и компенсации выставляли по контрольным немеченым, меченым GFP и меченым RFP клеткам *E.coli*. Данные обрабатывали в программе NovoExpress v.1.0. Проводили по три независимых опыта для каждого вида трансформации.

Результаты и обсуждение

Конъюгация у бактерий - форма обмена генетическим материалом между микроорганизмами при их клеточном контакте. Она была обнаружена в 1946 г. Ледербергом (J. Lederberg) и Тейтемом (E. L. Tatum) при исследовании штаммов двойных и тройных ауксотрофных мутантов *E. coli* K12. Частота проявления таких бактерий была равна 1 на каждые 10^7 высевных родительских клеток. Дальнейшее изучение показало, что они являются генетическими рекомбинантами, то есть клетками, несущими комбинацию генов родительских клеток. В последующих экспериментах, включая электронно-микроскопические наблюдения, было установлено, что обязательным условием для формирования таких рекомбинантов является непосредственный контакт между двумя генетически различающимися бактериями (рис. 1).

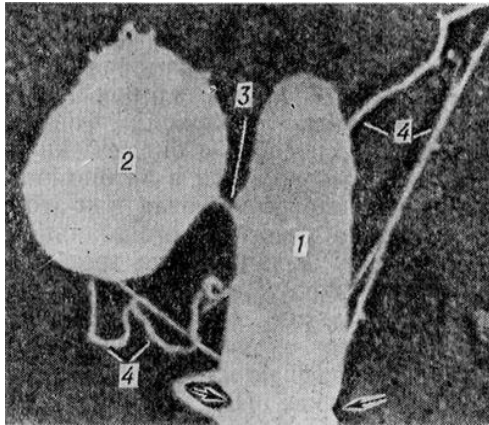


Рис. 1 Электронограмма конъюгирующих бактерий: 1-клетка-донор, находящаяся в стадии деления (место деления отмечено стрелками); 2-клетка-реципиент; 3-конъюгационный мостик, через который передается генетический материал донора реципиенту; 4- бактериальные жгутики.

Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-опероны, ответственные за перенос генетического материала. Ряд генов *tra*-оперонов определяет синтез половых пилей, другие отвечают за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. Образование F-пилей контролируется генами от *traA* до *traG* *tra*-оперона. От донора к реципиенту переносится только одна нить плазмидной ДНК. Началом переноса является сайт *oriT*, где с помощью продуктов генов *traY* и *traZ* образуется одностранный разрыв. Затем с участием гена *traD* происходит разделение нитей ДНК и образование кольцевых структур плазмидной ДНК. Экспрессия *tra*-генов регулируется на генетическом уровне. Транскрипция *tra*-оперона инициируется продуктом гена *traJ*. Его экспрессия репрессируется совместным действием продуктов генов *finO* и *finP*. Гены *traS* и *traT* отвечают за явление поверхностного включения.

Проблема переноса неконъюгативных плазмид, не обладающих набором *tra* генов, решается посредством процесса мобилизации. Неконъюгативные плазмиды - это, как правило, небольшие плазмиды, обладающие собственным началом переноса *oriT* и кодирующие релаксазу. Для переноса генов от донора к реципиенту таким плаздам необходимы конъюгативные плазмиды (Pansegrau, Lanka, 1996; Zechner, et al., 2000). Процесс передачи от одной бактериальной клетки другой неконъюгативных плазмид либо хромосомных генов с участием конъюгативных плазмид по типу плазмидной помощи называется мобилизацией. Суть «плазмидной помощи» заключается в перемещении неконъюгативных плазмид из клетки-донора в клетку-реципиент благодаря их взаимодействию с

конъюгативной плазмидой. Перемещаемые плазмиды называются мобилизуемыми.

Известны два основных механизма мобилизации неконъюгативных плазмид:

- перенос неконъюгативной плазмиды за счет продуктов *tra*-генов конъюгативной. В процессе участвует *oriT*-сайт неконъюгативной плазмиды и ее гены *mob*;
- перенос неконъюгативной плазмиды в составе коинтегратов с конъюгативными плаздами.

Образование коинтегратов происходит при объединении двух и более репликационных участков за счет реципрокной рекомбинации по участкам гомологии между репликационными участками. Такие участки могут создаваться *Is*- и *Tn*-элементами. При этом плазмиды со строгим контролем репликации подчиняются репликационному аппарату бактериальной хромосомы и могут существовать в ее составе неопределенно долго. Такие плазмиды с двойным образом жизни получили название эписом.

Плаزمида содержит генетический район, участвующий в мобилизации - *mob*. Белки, требуемые для мобилизации, в большинстве случаев кодируются кластером трех генов *mobABC*, которые транскрибируются в разных направлениях от промоторов, смежных с начальной точкой начала переноса (*orfY*) (Zhang, Meyer, 1995). Передача плазмиды или хромосомы начинается с одностранным разрывом в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи.

Большой практический интерес представляют экспериментальные данные о передаче при внутривидовых, межвидовых и межродовых скрещиваниях различных бактерий конъюгативных плазмид. Нами в данной работе для исследования конъюгативной активности различных штаммов клубеньковых бактерий предполагалось использовать мобилизуемые плазмиды, несущие маркерные гены флуоресцентных белков. Сами по себе данные конструкции в ГПГ участвовать не могут, но если клетка реципиент является конъюгативно активной, т.е. содержит *tra*-гены, то такие плазмиды становятся способными к горизонтальному переносу между штаммами.

В качестве таких плазмид нами были использованы *pJNTurboGFP* и *pJNTurboRFP*, несущие гены зеленого и красного флуоресцентных белков соответственно. Поскольку данные конструкции содержат *mob* участок плазмиды *pBBR1* и являлись мобилизуемыми плаздами, не исключалась возможность их участия в ГПГ в присутствии конъюгативных плазмид. Для этого два штамма бактерии *Rhizobium leguminosarum* GL3 и GL9 были трансформированы плазмидными конструкциями

pJNTurboGFP и *pJNTurboRFP*, соответственно. После их совместного культивирования на твердой питательной среде, клетки были проанализированы на проточном цитофлуориметре.

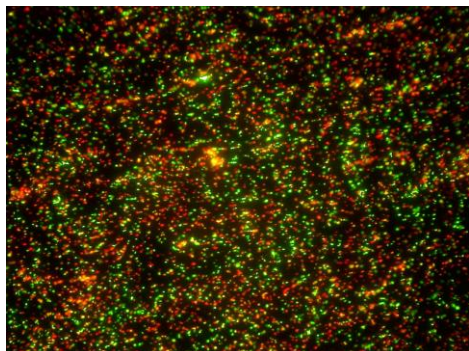


Рис.2. Фотография совместной культуры клеток штаммов GL3 (GFP) и GL9 (RFP) *Rhizobium leguminosarum* (микроскоп Axio Imager M1).

При анализе на самом деле был обнаружен переход *mob* содержащих маркирующих плазмид между штаммами клубеньковых бактерий. Так, выявлено образование штаммов имеющих как зеленое, так и красное свечение, т.е., были обнаружены клетки имеющие в своем составе как GFP так и RFP (рис. 3). По-видимому, можно предположить, что один из испытываемых штаммов имел в своем составе плазмиду, способную к мобилизации данных конструкций.

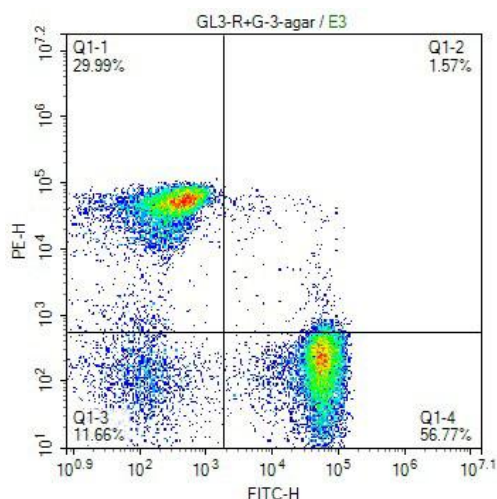


Рис.3. Разделение популяций клеток ризобий методом проточной цитометрии. Нижний левый квадрант - дебрис, мертвые нефлуоресцирующие клетки, верхний левый квадрант - клетки штамма GL9 *R.leguminosarum*, содержащие RFP, нижний правый квадрант - клетки штамма GL3 *R.leguminosarum*, содержащие GFP, верхний правый квадрант – пул клеток, содержащий оба маркирующих белка.

Таким образом, предложенный нами метод исследования конъюгативной активности между штаммами клубеньковых бактерий является работоспособным и дает возможность констатировать факт конъюгативного взаимодействия между ними.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования РЦКП «Агидель», ЦКП «Биомика» и УНУ «КОДИНК».

Литература

- Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Матниязов Р.Т., Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. Современная систематика клубеньковых бактерий // Биомика. 2013. Т.5. С.136-157.
- Баймиев Ан. Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. С.984-991.
- Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Ворошилова В.А., Данилова Т.Н., Жернаков А.И., Жуков В.А., Королева Т.А., Кузнецова Е.В., Мадсен Л., Мофетт М., Наумкина Т.С., Неманкин Т.А., Овчинникова Е.С., Павлова З.Б., Петрова Н.Э., Пинаев А.Г., Радугиной С., Розов С.М., Рычагова Т.С., Соловов И.И., Стоугаард И., Топунов А.Ф., Уиден Н.Ф., Цыганов В.Е., Штарк О.Ю., Тихонович И.А. Регуляторные гены гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующие развитие азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. С. 265–271.
- Воробьева Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. М.: Высш. шк., 1989. 294 С.
- Дебабов В. Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. М.: Высш. шк., 1988. 211 С.
- Онищук О.П., Симаров Б.В. Генетическая изменчивость нодуляционной конкурентоспособности у клубеньковых бактерий и ее использование в селекции // Генетика. 1995. Т. 31. С. 293 – 303.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1573-1587.
- Симаров Б.В., Аронштам А.А., Новикова Н.И., Проворов, Н.А., Симаров Б.В., Шарыпова Л.А. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Л.: Агропромиздат, 1990. - 192 с.

- Brom S., de los Santos A.G., de Lourdes Girard M., Davilla G., Palacios R., Romero D. Highfrequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 1344–1346.
- Guo X., Flores M., Mavingui P., Fuentes S.I., Hernandez G., Davila G., Palacios R. Natural genomics design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. // Genome Res. 2003. V. 8. P. 1810–1817
- Herrera-Carvera J.A., Sanjuan-Panilla J.M., Oliveres J., Sanjuan J. Cloning and identification of conjugative transfer origins in *Rhizobium meliloti* genome // J. Bacteriol. 1998. V.180. P.4583-4590.
- Henderson D. and Meyer R. The MobA-linked primase is the only replication protein of R1162 required for conjugal mobilization // J. Bacteriol. 1999. V. 181, 2973-2978.
- Krol J., Mazur A., Marczak M., Skorupska A. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum* // Genomics. 2007. V. 89. P. 237–247.
- Jumas-Bilak E., Michaux-Charachon S., Bourg G., Ramuz M., Allardet-Servent A. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. // J Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2749–2755.
- Lin J-J. Electrotransformation of *Agrobacterium* / In: Methods in molecular biology. Ed. Nickoloff J.A. Totowa: Humana Press, 1995. pp. 171–178.
- Meijer W.J., Wisman G.B., Terpstra P., Thorsted P.B., Thomas CM., Holsappel S., Venema G., Bron S. Rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*: complete nucleotide sequences and analyses of genes of pTA1015, pTA1040, pTA1050, and comparisons with related plasmids from gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 21. P. 337-368.
- Parniske M.. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. P. 763–775.
- Pansegrau W., Lanka E. Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 3455.
- Perwez T., Meyer R.J. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic and DNA sequence analysis of the mobilization region // Mol. Gen. Genet. 1999. V. 206. P. 161-168.
- Pretorius-Guth I.M., Puhler A., Simon R. Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2354-2359.
- Scherzinger E., Lurz R., Otto S., Dobrinski B. *In vitro* cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins // Nucleic Acids Res. 1992. Vol. 20. P.418.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // Biotechnology. 1983. V.1. P.784-791.
- Zhang S., Meyer R.J. Localized denaturation of oriT DNA within relaxosomes of the broad-host-range plasmid R1162 // Mol. Microbiol. 1995. V. 17. P. 727-735.
- Zhang S., Meyer R. The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer // Mol. Microbiol. 1997. V. 25. P. 509-516.

THE STUDY OF CONJUGATIVE ACTIVITY OF NODULE BACTERIA WITH THE MARKING OF STRAINS OF FLUORESCENT PROTEINS

*Gumenko R.S., *Vladimirova A.A., **Sargalieva G.M., **Simakhina A.C.,
*Zainullina L.F., *Baymiev Al.K., *Baymiev An.K.

*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, baymiev@anrb.ru
**Bashkir State University, Ufa, Russia

Nodule bacteria (rhizobia) is a genetically heterogeneous group of soil gram-negative microorganisms, able to enter into nitrogen-fixing symbiosis with legume plants. These microorganisms are characterized by a high plasticity of the genome associated largely with horizontal gene transfer, mostly by conjugation. In this paper, the proposed method of detection of conjugative interaction between strains of nodule bacteria based on their transformation of engineered structures on the basis of mobilized plasmids carrying marker genes are fluorescent proteins.

Keywords: conjugation, nodule bacteria, rhizobia, fluorescent proteins, horizontal gene transfer