

УДК 579.64

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *RAPA1* В КЛЕТКАХ МИКРОСИМБИОНТА *R. LEGUMINOSARUM* PVU5 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ, НИТРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ, БИОМАССУ И РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ РАСТЕНИЙ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Л.Р. Нигматуллина, А.М. Лавина, Э.Р. Сербяева, З.Р. Вершинина, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, molgen@anrb.ru

Целью данной работы было получение микросимбионтов с повышенной продукцией белка-адгезина RapA1 и анализ эффективности образования клубеньков данными рекомбинантными микросимбионтами на бобовых растениях, и впоследствии анализ нитрогеназной активности и ростовых параметров опытных растений. В ходе выполнения исследования использовался широкий ряд современных биохимических, молекулярно-биологических и прочих методов и технических подходов. В результате проведенной работы из микросимбионта фасоли обыкновенной *Rhizobium leguminosarum* PVu5 был выделен ген белка-адгезина *rapA1*. Данный ген был клонирован в вектор, которым впоследствии трансформировали данные бактерии, чтобы получить штаммы с конститутивной экспрессией белка RapA1. Обнаружено положительное влияние повышенной выработки белка RapA1 в *R. leguminosarum* PVu5 на образование клубеньков и ростовые параметры растений фасоли: обработка семян растений рекомбинантными ризобактериями увеличило количество клубеньков вдвое, а ростовые параметры на 52% по сравнению с контролем. Разработанный подход позволяет получать штаммы ризобий, с повышенной экспрессией гена *rapA1*, которые могут успешнее колонизировать корневую систему растений, чем «дикие» штаммы, тем самым оказывая положительное влияние, как на образование клубеньков, так и на рост биомассы и урожайности растений в целом, что существенно расширяет границы применения рекомбинантных бактерий в качестве биоудобрений.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, адгезин, агглютинация, рекомбинантные бактерии, биоудобрения, генная инженерия.

Адгезин *RapA1* относится к семейству Rap белков, которые обнаружены только у ряда близкородственных штаммов из рода *Rhizobium*: *R. leguminosarum* bvs. *trifolii*, *viciae*, *phaseoli* и *Rhizobium etli*. В естественных условиях белок RapA1 распознает полисахариды на поверхности бактерий и способствует агглютинации ризобий через клеточные полюса [Ausmees et al., 2001].

Для получения штаммов бактерий с конститутивной экспрессией гена *rapA1* в качестве основы для плазмидной конструкции был использован созданный ранее в лаборатории вектор pJN105TurboGFP на основе плазмиды широкого круга хозяев pJN105, содержащий ген флуоресцентного белка серии TurboColors: TurboGFP [Баймиев и др., 2011]. С этой целью с помощью Pfu-полимеразы была амплифицирована кодирующая часть гена *rapA1* из ДНК *R. leguminosarum* штамма PVu5, выделенного из клубеньков фасоли обыкновенной. Затем амплифицированную ДНК клонировали в промежуточный вектор pAL-TA. Далее из плазмиды pJN105TurboGFP с помощью рестриктаз *Bam*HI и *Hind*III вырезали ген флуоресцентного белка *gfp* и на его место под управление сильного конститутивного промотора фага PT5 переклонировали ген *rapA1*. Для дальнейших опытов полученной плазмидой pJN105TurboRapA1 был трансформирован использованный для выделения гена *rapA1* микросимбионт фасоли *R. leguminosarum* PVu5.

Нами проведена проверка влияния конститутивной экспрессии гена *rapA1* в клетках микросимбионта на эффективность образования клубеньков, нитрогеназную активность, биомассу и ростовые параметры растений (обобщенные данные показаны в табл.). Для этого растения фасоли обработали исходным (*R. leguminosarum* PVu5) и рекомбинантным штаммом ризобий (*R. leguminosarum* PVu5+RapA1), в качестве контроля служили растения, не обработанные бактериями. Через месяц после закладки опыта были проведены замеры всех перечисленных показателей. У необработанных контрольных растений фасоли клубеньки отсутствовали. Во всех остальных ва-

риантах опытов клубеньки на корнях формировались, но их количество у растений фасоли, обработанных штаммом *R. leguminosarum* PVu5+RapA1, было примерно в 2 раза больше, чем у растений, инокулированных исходным штаммом *R. leguminosarum* PVu5.

Кроме того, было замечено, что у контрольных растений тормозился рост. Опытные растения, обработанные штаммом *R. leguminosarum* PVu5, достигали фазы цветения раньше и имели большие ростовые параметры, а растения фасоли, обработанные рекомбинантными ризобиями *R. leguminosarum* PVu5+RapA1, имели большее количество бутонов и, заметно, большие размеры. Полученные нами данные показывают, что обработка растений штаммами *R. leguminosarum* с повышенной экспрессией RapA1 увеличивает количество клубеньков и, соответственно, нитрогеназную активность, что, возможно, связано с лучшей адсорбцией ризобий на поверхности корней на начальных этапах симбиоза. Несомненно, улучшение ростовых параметров, сырой и сухой биомассы связано с улучшением азотного питания растений. Подобные эксперименты ранее проводились на клевере (*Trifolium pratense*), где повышенная конститутивная экспрессия гена *rapA1* в плазмиде pHC60 положительно влияло на конкурентоспособность штаммов ризобий *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. etli*, а также было показано увеличение адсорбционной способности бактерий к корням растений. Однако подсчета количества образовавшихся клубеньков не проводилось [Mongiardini et al., 2008, 2009].

Полученные данные не оставляют сомнений в том, что бактериальный адгезин RapA1 *R. leguminosarum* возможно использовать в качестве инструмента биоинженерии для улучшения эффективности формирования существующих эндосимбиозов.

Исследования проводились при финансовой поддержке грантов РФФИ №№ 14-04-9700-п_поволжье_a и № 16-04-00902-а.

Таблица. Влияние конститутивной экспрессии гена *rapA1* в клетках микросимбионта на эффективность образования клубеньков, нитрогеназную активность, биомассу и ростовые параметры растений

Штаммы бактерий для обработки растений фасоли	Количество клубеньков (шт)	Длина стебля (см)	Сырая биомасса (г)	Сухая биомасса (г)	Нитрогеназная активность (мкг N ₂ /мл/час)
контроль	–	13±0.7	3.6±0.4	0.72±0.15	–
<i>R. leguminosarum</i> PVu5	7±2	16±2.3	5.8±0.8	0.92±0.12	0.03±0.003
<i>R. leguminosarum</i> PVu5+RapA1	15±3	25±3.1	8.1±0.5	2.8±0.17	0.062±0.018

Библиографический список (References)

- Баймиев А.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. N 6. С. 984–991.
- Ausmees N., Jacobsson K., Lindberg M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* // Microbiology, 2001. V. 147. P. 549–559.
- Mongiardini E.J., Ausmees N., Perez-Gimenez J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation // FEMS Microbiol Ecol, 2008. V.65. P. 279–288.
- Mongiardini E.J., Perez-gimenez J., Althabegoiti M.J., Covelli J., Quelas J.I., Lopez-garcia S.L., Lodeiro A. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases competitiveness for nodulation // Soil Biology and Biochemistry, 2009. V.41. P. 2017–2020.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 118–119

ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF CONSTITUTIVE EXPRESSION OF *RAPAI* GENE IN *R. LEGUMINOSARUM* PVU5 ON THE EFFICIENCY OF NODULATION, NITROGENASE ACTIVITY, BIOMASS AND GROWTH PARAMETERS OF *PHASEOLUS VULGARIS* L. PLANTS

L.R. Nigmatullina, A.M. Lavina, E.R. Serbaeva, Z.R. Vershinina, Al.K. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Centre RAS, molgen@anrb.ru

Developed approach produces rhizobia strains with increased expression of the gene *rapA1*, which can effectively colonize the root system of the plant as compared to the «wild» strains, thereby exerting a positive influence both on the nodulation and growth of the biomass and plant yield, significantly expands the application of recombinant bacteria as biofertilizers.