



УДК 577.21:579.252.5:579.842

## **ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ СОЗДАНИЕ АЗОТФИКСАТОРОВ НОВОГО ТИПА, СПОСОБНЫХ РАЗВИВАТЬСЯ И ФИКСИРОВАТЬ АЗОТ АТМОСФЕРЫ В НЕБОБОВЫХ РАСТЕНИЯХ**

**В. А. Кордюм, Н. А. Козыровская, Н. В. Гуньковская**

Несмотря на то, что биосфера в прямом смысле слова «купается» в азоте — над каждым квадратным километром поверхности нашей планеты атмосфера содержит около 8 млн т данного элемента, — для живого он является наиболее дефицитным и в значительной мере лимитирует протекание биологических процессов на Земле. Практически весь азот, включаемый в биологические превращения, вовлекается за счет биологической азотфиксации. Его количество оценивается в 139 млн т в год [1], и продуктивность биосферных процессов определяется этой величиной. В еще большей мере это касается сельскохозяйственного производства. Здесь для устранения азотного дефицита используют минеральные удобрения. Однако даже в развитых странах химическая промышленность не в состоянии полностью удовлетворить потребности в связанном азоте, а в общем балансе биологическая азотфиксация на полях поставляет растениям столько, сколько дает его вся химическая промышленность. Но в развивающемся мире этого недостаточно. Кроме того, растения усваивают лишь 30—40 % внесенного удобрения. Остальное в конце концов вымывается и, попадая в реки, озера, водохранилища, вызывает цветение, развитие нежелательных организмов. В довершение негативного влияния связанный азот на своем пути подавляет биологическую азотфиксацию, в результате чего эффект от внесения его в почву снижается еще больше, так как надо увеличить дозу препарата, чтобы компенсировать убыль естественных процессов.

Не менее впечатляюще выглядит и экономическая сторона проблемы. Только на промышленное производство азотных удобрений ежегодно во всем мире расходуется более 1,6 % всей потребляемой человечеством энергии [2].

Еще больше тратится ее на последующих этапах — хранении, транспортировке, внесении и т. п. Если сюда добавить энергетические затраты на очистку окружающей среды, возрастающие усилия для добытия прежнего количества продуктов водоемов, лесов и т. д., скучающих от загрязнений, то энергия, связанная с производством азотных удобрений, по-видимому, превысит 3,5 % общего мирового ее потребления и составит в условном, «нефтяном», исчислении более 600 млн т ежегодно. И это только расход энергии в чистом виде, не считая стоимости заводов, транспорта, рабочей силы и т. д.

Иное решение в свое время найдено эволюцией — до человека потребности в связанном азоте во всех без исключения звеньях в биосфере удовлетворялись за счет биологической азотфиксации. В усредненном пересчете азотфиксация обеспечивает поступление на каждый гектар поверхности нашей планеты несколько более 12 кг связанного

азота в год [3]. Учитывая реальные перспективы, по-видимому, единственной возможностью, которую сегодня признают во всем мире, и решающей если не все, то по крайней мере основные проблемы, является такая интенсификация и перераспределение биологической азотфиксации, которые, приобретая новое качественное звучание, устранят потребности в азотных химических удобрениях.

Развитие молекулярной генетики и генетической инженерии позволят в обозримом будущем решить эту проблему. Ее анализ дал возможность сформулировать нам в 1982 г. 11 направлений поиска на пути удовлетворения потребностей сельского хозяйства в связанном азоте: изменение спектра почвенной азотфиксирующей микрофлоры; повышение эффективности функционирования клубеньковых бактерий в бобовых растениях; широкая практическая реализация потенциальных возможностей азотфиксирующих спирилл; поиски в природе новых азотфиксирующих симбионтов; придание клубеньковым бактериям способности развиваться на небобовых растениях; придание способности к симбиозу несимбиотическим азотфиксаторам; придание способности фиксировать азот актиномицетным (т. е. прокариотическим) микоризам; создание симбионтов-органелл, фиксирующих азот (нитросом) в клетках эукариотических объектов; придание способности фиксировать азот атмосферы непосредственно высшим растениям; придание способности фиксировать азот атмосферы прокариотам, развивающимся в растениях; получение «азотфиксирующих» животных за счет придания азотфиксирующей способности населяющей их микрофлоре. К ним примыкают четыре самостоятельные задачи, общие для всех направлений: защита биологической азотфиксации от кислородной инактивации; повышение эффективности азотфиксации; повышение интенсивности азотфиксации; проблемы конкурентоспособности вносимых в природу искусственно созданных, улучшенных или измененных форм по отношению к их диким сородичам, занимающим идентичные экологические ниши [4]. Сегодня можно сформулировать еще одно направление, к которому в отличие от остальных, изложенных выше, задачи не имеют прямого отношения: селекция растений, способных более эффективно взаимодействовать с азотфиксирующими бактериями [5, 6].

Пока наиболее эффективно развиваются первые три направления. Однако, несмотря на значительную концентрацию сил и средств и несомненные достигнутые успехи, очень четко выявились принципиальные ограничения этих направлений. В почве как качественный, так и количественный состав азотфиксирующих бактерий весьма велик [7]. Так, например, в ризосфере сорго и проса выделяемые азотфиксаторы относятся не менее чем к 22 родам [8]. Немало их можно изолировать из филосферы [9]. Однако среди форм, обитающих непосредственно на корнях (а не в прикорневой зоне), азотфиксаторов мало [10]. В то же время центральной проблемой накопления связанного азота бактериями являются энергетика и конкурентный перехват. Растения — основной поставщик энергии, и корневые выделения во многом обеспечивают энергетические потребности почвенных бактерий. Лучше всего энергией обеспечены те микроорганизмы, которые непосредственно развиваются на поверхности корней. По мере удаления от последних концентрация органических соединений круто падает. С другой стороны, азот, образующийся в отдалении от корней, эффективно перехватывается бактериями.

Благодаря работам ряда ученых, в значительной мере инициированных и выполненных В. Клингмюллером [11—13], развились исследования по переносу *nif*-генов в бактерии, развивающиеся на корнях растений. Сегодня можно получать самые разнообразные азотфиксирующие производные таких бактерий. Можно ожидать, что в будущем эти работы получат и практическое применение. Однако при переносе таких азотфиксаторов в почву возникнут два принципиальных ограничения. Первое связано с тем, что даже в таком случае энергетика окажется все равно крайне напряженной, существенно ограничивающей

потенциальные возможности новых азотфиксаторов. Второе связано с занятостью экологических ниш и проблемой конкурентоспособности вносимых искусственно получаемых форм с их дикими, более приспособленными сородичами.

Повышение эффективности клубеньковых бактерий уже привело к хорошим практическим результатам [2], но оно ограничено почти исключительно бобовыми растениями.

Что же касается азоспирилл, то их изучение подтвердило перспективность направления и в ряде случаев продемонстрировало в модельных экспериментах весьма неплохие результаты [14]. Однако работ, далеких от оптимизма, также немало и основаны они на вполне добротном экспериментальном материале. Кроме того,стораживает и весьма небольшой вклад азоспирилл в общий фонд накопления азота в природе, что неблагоприятно контрастирует с аналогичными данными для систем клубеньковые бактерии — бобовые растения. Это дает основание полагать, что хотя азоспириллы со временем и найдут практическое применение, но вряд ли решат проблему дефицита связанного азота. Последняя скорее всего будет решена комплексно, с использованием разных подходов.

В этой связи весьма перспективным представляется направление, связанное с получением азотфиксирующих производных бактерий, естественно развивающихся в тканях небобовых растений, но природно неспособных к усвоению азота атмосферы.

Идея этого направления была сформулирована нами в качестве рабочего положения в 1978 г. и опубликована вместе с первыми экспериментальными данными в 1980 г. [15]. Перечень бактерий, развивающихся в растениях, весьма обширен, а взаимоотношения компонентов такого сообщества сложны и динамичны. Наиболее интересна в рассматриваемом плане группа фитопатогенных бактерий. Их развитие вызывает поражения растений, приводящие к падению урожая. Но во многих случаях они развиваются без нанесения ущерба хозяину. Хорошей аналогией являются энтеробактерии, обитающие в пищеварительном тракте млекопитающих. Польза макроорганизму от них постоянная и значительная, а вред в случае приобретения этими микроорганизмами патогенных свойств (например, вследствие переноса в их клетки соответствующих генов на плазмидах), хотя и имеет яркое выражение, но преходящ. Часто и фитопатогенные бактерии обитают в тканях и на поверхности растений, не вызывая патологий. Зато хозяйская специфичность, т. е. способность проникать в определенные ткани определенных растений и развиваться в них, присуща постоянно. В то же время сегодня техника переноса *nif*-генов в различные прокариоты отработана весьма эффективно, а передача хозяйской специфичности осуществляется лишь за счет переноса симбиотических плазмид клубеньковых бактерий в иные виды и затрагивает способность заражать бобовые растения [16] и немногочисленные, не имеющие сколько-нибудь существенного хозяйственного значения, небобовые, на которых в природе развиваются некоторые клубеньковые бактерии [17].

Придание бактериям, развивающимся в растениях и образующим там заметную биомассу, способности фиксировать азот атмосферы, обходит эту трудность, связанную с неумением передавать (за исключением редких и ограниченных случаев) хозяйскую специфичность, и одновременно позволяет подойти к решению двух других проблем. Во-первых, получаемые таким путем микроорганизмы не должны вытесняться почвенными бактериями, так как занимают свободную экологическую нишу. Во-вторых, находясь внутри растений, они не должны испытывать столь острого дефицита в источниках энергии, как это имеет место у форм, развивающихся на поверхности растений.

Для экспериментального обоснования избранного нами направления и учитывая отсутствие в литературе подобных работ, необходимо было ответить на следующие вопросы.

1. Будет ли осуществляться перенос *nif*-генов в фитопатогенные бактерии, естественно развивающиеся в растениях, или в процессе переноса *nif*-кластер полностью или частично подвергнется элиминации?

2. Будет ли происходить экспрессия генов, отвечающих за азотфиксацию, если перенос произойдет?

Решение этих вопросов надо было начать с выбора объектов исследования. Микроорганизмов, взаимодействующих с растениями, очень много и их таксономическая принадлежность исключительно разнообразна. Среди них имеются и азотфиксирующие формы. Так, в природе существуют азотфиксирующие бактерии, развивающиеся внутри ткани, формируя на листьях и стеблях небобовых растений подобие клубеньков [18]. Известны виды бактерий, близкие фитопатогенным, способные усваивать азот атмосферы [19, 20]. Некоторые бактерии, развивающиеся в тканях растения-хозяина, родственны классическим азотфиксаторам-ризобиям [21]. Однако, как и в случае ризобий, эти бактерии обладают строгой хозяйской специфичностью и не способны развиваться в основных сельскохозяйственных растениях. В изобилии распространены ризосферные и эпифитные микроорганизмы. У них, как правило, отсутствует узкая хозяйская специфичность, но их биомасса на единицу массы растения столь мала, что трудно ожидать заметного вклада в обеспечение растения связанным азотом в случае изменения того или иного вида данной группы в нужном направлении. Кроме того, их экзогенная локализация неизбежно приведет к возникновению проблем, отмеченных выше.

По совокупности показателей наиболее перспективными, как нам представляется, являются фитопатогенные бактерии. У них эволюционно отработан механизм проникновения в растение, размножения в нем, что обеспечивает высокую степень контакта с растительной клеткой. При развитии в растении они накапливают значительную биомассу в отличие от эпифитных и ризосферных бактерий. Одни и те же виды фитопатогенов имеют широкий спектр агрессивности по отношению к растению-хозяину, что позволило бы отбирать нужные формы, а изменение экспериментальным путем степени агрессивности не представляет непреодолимых трудностей. Заражение растений слабовирулентными штаммами обеспечило бы, кроме того, иммунизацию его к повторной инфекции, что имело бы дополнительное важное практическое значение.

Фитопатогенные бактерии — благоприятный материал для генетической инженерии. Для многих групп разработаны эффективные способы переноса генетической информации [22, 23]. Описаны плазмиды и изучены их свойства у представителей наиболее распространенных родов *Agrobacterium* [24, 25], *Erwinia* [26—29], *Pseudomonas* [30, 31] *Corynebacterium* [32]. Клонированы гены патогенности у представителей родов *Erwinia* [33—40], *Xanthomonas* [41, 42], *Pseudomonas* [43].

Таким образом, в настоящее время манипулирование генетическим материалом фитопатогенных бактерий не представляет принципиальных трудностей. Анализ возможности использования фитопатогенных бактерий для создания новых азотфиксирующих форм, развивающихся в небобовых растениях, позволил нам выбрать в качестве модельных объектов бактерии *Erwinia* и *Xanthomonas*. Это объясняется следующими моментами. Во-первых, представители указанных родов являются хорошими реципиентами плазмид *PI* группы несовместимости, что важно для переноса в их клетки *nif*-генов [44, 45]. Во-вторых, развиваясь в тканях растения-хозяина, они накапливают значительную биомассу и создают, таким образом, благоприятные условия для тестирования экспрессии *nif*-генов (и накопления связанного азота). В-третьих, вирулентные свойства этих бактерий легко и быстро тестируются в лабораторных и полевых условиях на доступном растительном материале. Наконец, в-четвертых, такой выбор открывает возможность использования широкого диапазона хозяйской специфичности.

Вид *E. aroideae* относится к мягкогнилостной группе бактерий «*carotovora*». Отличительной особенностью этого вида является выде-

ление значительного количества пектолитических ферментов и способность вызывать мацерацию паренхиматических тканей широкого круга растений.

Вид *X. beticola* является узкоспециализированным возбудителем заболевания свеклы. Тип заболевания по внешним признакам похож на корончатый галл, но принципиально отличается от него: развитие опухоли прогрессирует только в присутствии бактерий. Анатомическое различие между корончатым галлом и опухолью, вызываемой ксантомоной, состоит в том, что при корневом раке внутренняя ткань опухоли твердая, а в наростах, вызываемых ксантомоной, — рыхлая, внутри ее имеются каверны, заполненные бактериями-возбудителями.

Избрав указанные виды бактерий в качестве реципиентов *nif*-генов, мы приступили к конструированию азотфиксирующих форм этих бактерий. К началу работы были уже получены *nif*-плазмиды, имеющие в своем составе весь набор *nif*-генов *Klebsiella pneumoniae*, и показана экспрессия этих генов у *E. coli* [46], *Salmonella typhimurium* [47]. В своей работе мы использовали плазмиду с широким кругом хозяев *pRD1 (Rfb Gnd His Nif Shi A Km Tc Carb)* [48], любезно предоставленную нам д-ром А. Кондорони (Венгрия).

Методом конъюгации плазида была введена в реципиентные виды бактерий *E. aroidae* и *X. beticola* из *E. coli*. Частота такого переноса оказалась для разных объектов различной [49]. В одном случае (*E. aroidae*) частота переноса детерминантов устойчивости к антибиотикам, кодируемым плазмидой, была высокой и совпадала с частотой переноса *nif*-генов. В другом случае (*X. beticola*) такой корреляции не наблюдалось. Некоторые примеры осуществленных переносов представлены в табл. 1. Гены антибиотикоустойчивости, будучи переданными, стабильно наследовались у всех исследуемых трансконъюгантов и выражались, как правило, более эффективно, чем у донора [50].

Детальное исследование стабильных по *Nif*-фенотипу клонов эрвинии и ксантомоны выявило некоторые особенности экспрессии ге-

Таблица 1

Перенос маркеров *pRD1* из *E. coli* K-12 JC5466 в исследуемые бактерии  
Transfer of *pRD1* markers from *E. coli* K-12 JC5466 to bacteria studied

Реципиент	Селекция	Частота переноса маркеров	
		<i>Km<sup>r</sup> + Tc<sup>r</sup> + Carb<sup>r</sup></i>	<i>Nif<sup>+</sup></i>
<i>X. beticola</i> 7325	<i>pro trp Km<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> Carb<sup>r</sup></i>	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
<i>X. beticola</i> 8717	То же	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
<i>E. aroidae</i> 8634	»	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$9,3 \cdot 10^{-2}$
<i>E. aroidae</i> 8917	»	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$
<i>E. coli</i> HB101	<i>Sm<sup>r</sup> Km<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup></i>	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$

Таблица 2

Ацетиленредуктазная активность трансконъюгантов  
Acetylene reductase activity of transconjugants

Вид, штамм бактерий	Количество этилена, нмоль	Время, ч	Количество белка, мг	Ацетиленредуктазная активность, нМ C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /мг·ч
<i>X. beticola</i> 8717.33	470±29	7	0,22	305±10
<i>X. beticola</i> 8717.11	4900±55	7	0,22	3180±37
<i>X. beticola</i> 7325.10	567±21	7	0,21	386±14
<i>E. aroidae</i> 8634.1	140±19	7	0,13	153±10
<i>E. aroidae</i> 8917.1	600±17	7	0,13	660±21
<i>E. coli</i> K-12 JC5466	410±4	9	0,10	580±7
<i>K. pneumoniae</i> SK-24	4758±27	9	0,17	3110±48

пов азотфиксации в их клетках по сравнению с донорным штаммом *E. coli* JC5466 (*pRD1*) [51]. Во-первых, ацетиленредуктазная активность этих клонов значительно превосходит по величине таковую донора (табл. 2). Это может быть связано с тем, что у новых хозяев изменена регуляция по сравнению с донорным штаммом, а также с хромосомной локализацией *nif*-генов. Во-вторых, трансконъюганты эрвинии и ксантомонаса экспрессируют *nif*-гены в аэробных условиях. При содержании

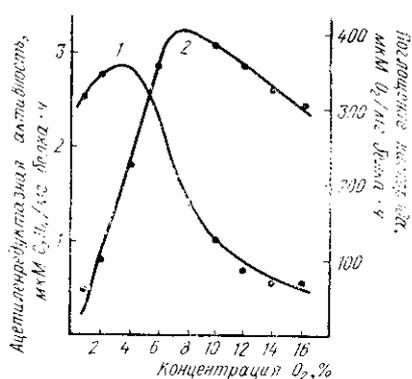


Рис. 1. Влияние кислорода на ацетиленредуктазную активность *X. beticola* 8717.11: 1 — ацетиленредуктазная активность; 2 — поглощение кислорода.

Fig. 1. The effect of oxygen on the acetylene reductase activity of *X. beticola* 8717.11: 1 — acetylene reductase activity; 2 — oxygen uptake.

Рис. 2. Диски клубней картофеля, пораженные бактериями *E. aroidae*. Учет через сутки после заражения. К — контрольная, неинфицированная ткань.

Fig. 2. Disks of potato tubers infected with bacteria *E. aroidae*. The account was taken 24 h after infection. K — control, uninfected tissue.

кислорода в газовой фазе в количестве 15—16 % клетки сохраняют 15—20 % ацетиленредуктазной активности, достигаемой при оптимуме O<sub>2</sub> (рис. 1). Это свидетельствует о наличии у них защиты нитрогеназы от кислородной инактивации.

Таким образом, было установлено, что нет принципиальных запретов на перенос *nif*-генов в фитопатогенные бактерии.

3. Будет ли иметь место устойчивость *Nif*-фенотипа или выражение генов азотфиксации окажется неустойчивым, а сам *nif*-кластер быстро функционально инактивируется? Исследование экспрессии генов азотфиксации у трансконъюгантов ксантомонаса показало, что в результате конъюгации сформировалось три типа производных: *Nif*<sup>-</sup>-клоны, стабильные *Nif*<sup>+</sup>-клоны и нестабильные *Nif*<sup>+</sup>-клоны [15]. Последние теряли *nif*-гены через три пассажа в неселективных условиях. Результаты электрофореза в агарозном геле плазмидной ДНК и обратный перенос плазмиды в *E. coli* свидетельствуют о том, что в этих клонов произошла сегрегация *nif*<sup>+</sup>-признака (обычное явление для плазмиды *pRD1* в *recA* штаммах *E. coli* [52]), следствием чего явилось образование плазмиды меньшей молекулярной массы, утратившей *nif*-гены, но сохранившей детерминанты устойчивости к *Km*, *Tc*, *Carb* [49, 50].

Анализ ДНК, изолированной из первичных клонов трансконъюгантов ксантомонаса (сохранивших при дальнейших пассажах в неселективных условиях *Nif*-фенотип), в геле агарозы с помощью электрофореза показал присутствие в их клетках плазмиды, молекулярная масса которой соответствует таковой плазмиды *RP4* — исходной для конструирования *pRD1*. Электронно-микроскопическое исследование плазмидных препаратов этих клонов выявило совпадение молекулярных масс исследуемой плазмиды и *RP4*, а рестрикция эндонуклеазами *EcoRI* и *BamHI* — идентичность их сайтов рестрикции.

Перенос плазмиды *pRD1* из *E. coli* в клетки эрвинии и ксантомонаса привел к изменению у них культурально-биохимических свойств. Наиболее заметно выражено оно у трансконъюгантов ксантомонаса. Особенно отличались в этом отношении стабильные *Nif*<sup>+</sup>-формы. Введение плазмиды коррелировало у них с изменением морфологии клетки и колоний, потерей характерного желтого пигмента на агаризованных питательных средах, появлением признаков, характерных для донора [15, 50].

Наблюдались изменения биохимических свойств у трансконъюгантов эрвинии под влиянием введения в их клетки плазмиды *pRD1*, однако они не столь заметны, как у производных ксантомонаса [50, 53].

Таким образом, хотя перенос *nif*-генов и сопровождался рядом изменений у фитопатогенных бактерий, тем не менее можно было получить устойчивые азотфиксирующие производные, стабильно сохраняющие *nif*<sup>+</sup>-признак в неселективных условиях.

4. Сохранится ли способность искусственно полученных форм бактерий развиваться в растении в случае устойчивости *Nif*-фенотипа? Используя плазмиды в исследованиях для получения новых штаммов бактерий с заданными свойствами, можно ожидать изменения не только культурально-биохимических свойств, но и характера их взаимоотношений с хозяином, если такие взаимоотношения им свойственны. В литературе описаны подобные случаи. Так, происходила потеря вирулентности фитопатогенными бактериями после введения в их клетки транспозонов с помощью плазмид *P1* группы несовместимости [23]. Отсутствовала онкогенная активность у *A. tumefaciens* вследствие специфического взаимодействия введенной в агробактерии *pSa* и резидентной плазмиды *Ti* [54]. В наших работах введение *pRD1* в клетки ксантомонаса и эрвинии привело к изменению у этих бактерий вирулентности. У небольшого процента трансконъюгантов ксантомонаса наблюдалась утрата вирулентных свойств, причем она коррелировала со стабильным *Nif*-фенотипом бактерий [15]. У нестабильных форм, а также *Nif*<sup>-</sup>-форм ксантомонаса наблюдали повышение способности взаимодействия с тканями свеклы. Это проявлялось в возрастании скорости распространения бактерий в тканях и увеличении размеров наростов на ткани свеклы по сравнению с диким типом. Присутствие других плазмид *P1* группы несовместимости (*RP4*, *R68.45*) оказывает подобное влияние. Возможно, усиление активности исследуемых бактерий в присутствии в клетках плазмид *Inc P1* группы связано с изменением компонентов клеточной мембраны, влекущим за собой изменение ее вязкости и повышение проницаемости. Последнее важно как для поступления в клетку бактерий питательных веществ из растения-хозяина, так и для выхода продуктов бактериального происхождения.

Введение плазмиды *pRD1* в клетки одного из штаммов эрвиний, 8947, сопровождалось резким возрастанием уровня синтеза пектолитических ферментов, что приводило к усилению мацерации растительных тканей трансконъюгантами в 2—3 раза [50, 53] (рис. 2). Пектолитическая активность трансконъюгантов другого штамма эрвиний, 8634, была несколько ослаблена по сравнению с диким. Стабильные по *Nif*-фенотипу производные эрвинии сохраняли вирулентные свойства после 10 пассажей через ткань клубней картофеля и корня моркови. Не терялись эти свойства и при хранении культур в музее на протяжении пяти лет.

У авирулентных клонов трансконъюгантов ксантомонаса со стабильной экспрессией *nif*-генов после излечения от плазмиды происходила реверсия вирулентности, однако активность ревертантов в отношении растения-хозяина значительно слабее, чем у дикого типа. При пассировании излеченной от плазмиды *Nif*<sup>+</sup>-формы ксантомонаса в ткани корнеплода свеклы в течение шести пассажей вирулентные свойства бактерий сохранялись, а период между заражением ткани корнеплода свеклы и появлением наростов на их поверхности сократился.

Таким образом, стабилизация *Nif*-фенотипа трансконъюгантов

ксантомонаса и эрвиний, происходящая за счет включения *nif*-генов в хромосому, не приводила к инактивации или потере генов вирулентности и, как следствие того, неспособности их взаимодействовать с растением-хозяином.

5. Будет ли происходить полноценное функционирование *nif*-генов у трансконъюгантов при развитии их не на специальных средах, а в растении? В качестве моделей для выяснения возможности полноценного функционирования *nif*-генов *K. pneumoniae* у сконструированных гибридных форм бактерий в условиях их роста в ткани растения были избраны клоны трансконъюгантов *E. aroideae* и *X. beticola* со стабильным *Nif*-фенотипом. Экспрессию *nif*-генов у производных бактерий эрвиний тестировали методом редукции ацетилена на дисках клубней картофеля и корней редиса, моркови и редьки в микроэксекаторах собственной конструкции [53]. Исследуемые бактерии инокулировали на диски овощей и инкубировали сутки при оптимальной температуре роста. После проявления инфекции диски растительного материала помещали в микроэксекаторы и последние заполняли ацетиленовой смесью. Этилен, образуемый при восстановлении ацетилена нитрогеназой бактерий и выделяемый растительными тканями эндогенно, регистрировали методом газовой хроматографии. Количество эндогенного этилена было небольшим: 0,4 нмоль  $C_2H_4$  на диск клубня картофеля за 18 ч. В присутствии ацетилена исследуемые бактерии, развиваясь на ткани клубня картофеля, образовывали  $797 \pm 12$  нмоль  $C_2H_4$  на диск клубня картофеля за 18 ч. На безазотной питательной среде в тех же условиях эти бактерии выделяли  $600 \pm 17$  нмоль  $C_2H_4$  на флакон.

Таким образом, развиваясь в тканях растений, гибридные формы эрвиний редуцируют ацетилен столь же активно, как и на специальной питательной среде без азота. Этот вывод был подтвержден в испытании на ацетиленредукцию корней редиса, инфицированных *Nif*<sup>+</sup> эрвиниями. Количество этилена, образуемого в камерах микроэксекаторов с корнями редиса, составляло  $1220 \pm 41$  нмоль  $C_2H_4$  на один корень редиса при наличии следовых количеств эндогенного этилена в контрольных камерах.

В такой же последовательности — сначала на дисках корнеплодов, а затем на интактных растениях столовой свеклы — исследовали экспрессию *nif*-генов у гибридных форм ксантомонаса. Для этой цели использовали слабовирулентную *Nif*<sup>+</sup>-форму бактерий, излеченных от оставшейся части плазмиды *pRD1*.

Как и в экспериментах с модельной системой эрвиния — клубни картофеля, в системе ксантомонас — диск корнеплода свеклы в атмосфере ацетилена обнаружен этилен, по количеству в значительной мере превосходящий эндогенный.

Диски корнеплодов свеклы, простерилизованные этанолом и отмытые стерильной водой, инфицировали суспензией клеток исследуемых бактерий. После проявления инфекции ткани корнеплодов свеклы тестировали на редукцию ацетилена, а затем из них изолировали бактерии на селективной среде с палидиксовой кислотой (исследуемая стабильная по *Nif*-фенотипу форма ксантомонаса устойчива к последней) и полноценной питательной среде без селекции (для выявления возможных ревертантов к дикому типу, отличающемуся характерной пигментированной морфологией колоний). Выборку клонов-изолятов использовали для определения *Nif*-фенотипа и повторного заражения свежих дисков корнеплодов свеклы (второй пассаж и т. д.).

В контрольных экспериментах исследовали обеззараженные указанным выше способом диски корнеплода на бактериальную обсемененность, а также проводили изоляцию бактерий на полноценной питательной среде из дисков, инокулированных культурой *E. coli* HB101. В первом случае бактерии в ткани не были обнаружены, во втором — изолировались бактерии с характерной для кишечной палочки морфологией колоний и клеток, не редуцирующие ацетилен, авирулентные по отношению к тканям корнеплода свеклы.

В каждой из трех серий экспериментов (2,5—3 месяца) в 1—5 пассажах через растения наблюдали высокую ацетиленредуктазную активность тканей свеклы (табл. 3). Бактерии, изолированные в селективных условиях из дисков свеклы, имели *Nif*-фенотип практически у 100 % выборки клонов. В шестом пассаже обнаружен этилен в тканях, по количеству соответствующий эндогенному. Клоны-изоляты в этом случае имели *Nif*<sup>-</sup>-фенотип и проявляли вирулентные свойства. *Nif*<sup>-</sup>-изоляты ксантомонаса были хорошими реципиентами *pRD1*, которая переходила в их клетки из *E. coli* (*pRD1*) с частотой  $2 \cdot 10^{-2}$ . Ацетиленредуктазную активность проявляли 89,5 % клонов трансконъюгантов. Это свидетельствует о том, что в клетках трансконъюгантов есть условия для экспрессии *nif*-генов, и, таким образом, не изменения в системе общей азотной регуляции (*ntr*) являются следствием отсутствия *Nif*-фенотипа у 6-кратно пассированных в ткани корнеплода свеклы производных ксантомонаса. Причина потери *Nif*-фенотипа бактерий в растительных тканях через пять пассажей будет установлена в дальнейших экспериментах.

Таблица 3

Ацетиленредуктазная активность *X. beticola* 8717.11 в условиях развития в ткани корнеплода свеклы

*Acetylene reductase activity of X. beticola* 8717.11 under growth conditions in beet root tissue

№ пассажа	Количество клеток на 1 мг ткани	Количество этилена, нмоль	Удельное количество этилена, нМ/г сырого веса ткани·ч
1	$7 \cdot 10^8$	379	2100
2	$4 \cdot 10^8$	375	2083
3	$1 \cdot 10^8$	264	1466
4	$2 \cdot 10^7$	256	1422
5	$3 \cdot 10^6$	236	1311
6	$4 \cdot 10^6$	0,12	6

В отношении интактных растений свеклы исследуемые бактерии ксантомонаса *Nif*<sup>+</sup> проявляли слабую активность, поэтому их использовали в смеси с клетками ксантомонаса *Nif*<sup>-</sup> с высокой активностью в растительных тканях в соотношении 1:2 и 1:5. Используя смесь клеток, мы преследовали две цели: изучали экспрессию *nif*-генов трансконъюгантов ксантомонаса при развитии их в растении; исследовали конкурентоспособность *Nif*<sup>+</sup>- и *Nif*<sup>-</sup>-форм ксантомонаса в ткани растения.

Наросты на тканях корнеплодов свеклы, образуемые смесью клеток ксантомонаса, тестировали на ацетиленредуктазную активность. Количество этилена, образуемого исследуемыми бактериями в атмосфере ацетиленна ( $101 \pm 12$  нмоль  $C_2H_4$ /г сырого веса ткани за 1 ч), значительно выше выделяемого тканями свеклы и бактериями эндогенно (6 нмоль  $C_2H_4$ /г сырого веса ткани за 1 ч). Ацетиленредуктазную активность наросты тканей корнеплодов свеклы сохраняли на протяжении почти всего вегетационного периода свеклы (около 4 месяцев). После четырех месяцев инкубирования смеси *Nif*<sup>+</sup>- и *Nif*<sup>-</sup>-форм ксантомонаса указанная активность у изолированных в селективных условиях бактерий не была обнаружена.

Таким образом, экспериментально показано, что *nif*-гены *K. pneumoniae* активны у трансконъюгантов *E. arzoideae* и *X. beticola* при развитии их в растении-хозяине, а у производных ксантомонаса стабильно поддерживаются клетками на протяжении длительного периода инкубирования их *in planta*, фактически равного вегетационному.

6. Будет ли устойчива популяция *Nif*<sup>+</sup>-производных в растениях? Проблема сохранения гибридных *Nif*<sup>+</sup>-форм бактерий в естественной среде обитания содержит две основные трудности: 1) вытеснение их более конкурентоспособными дикими формами; 2) реверсию к дикому

*Nif*<sup>-</sup>-типу, имеющему селективное преимущество перед *Nif*<sup>+</sup>-формами. Нам предстояло решить, какова ситуация сохранения стабильности *Nif*-фенотипа производных ксантомонаса и эрвиний в растительных тканях, а также определить, являются ли *Nif*<sup>+</sup>-формы бактерий конкурентоспособными с дикой формой.

В отношении неспециализированных бактерий *E. aroidae* с широким кругом хозяев выяснено, что в лабораторных условиях на тканях овощных культур в течение двух суток *Nif*-фенотип сохраняли от 40 до 70 % клеток [53]. В экспериментах, выполненных в открытом грунте на интактных растениях (редис), показано, что практически все клетки, изолированные из пораженной ткани на полноценной питательной среде через 7 сут после проявления инфекции, имели *Nif*-фенотип; через 30 сут — кроме *Nif*<sup>+</sup>-форм эрвиний, выделялись также бактерии, проникающие в места поражения ткани из почвы; последние отличались от эрвиний по морфологии колоний, не обладали вирулентными свойствами и имели *Nif*<sup>-</sup>-фенотип. Количественно *Nif*<sup>-</sup> и *Nif*<sup>+</sup> бактерий были представлены как 10 : 1.

Таким образом, *Nif*<sup>+</sup>-производные *E. aroidae* занимают свободную экологическую нишу на корнях редиса, развиваясь в его ткани, и сохраняют *Nif*-фенотип, однако подвергая мацерации паренхиме растения-хозяина, создают благоприятные условия для заселения некротизированной ткани сапрофитными бактериями из почвы.

*X. beticola* — узкоспециализированные бактерии и развиваются только в ткани корнеплода свеклы, занимая свою экологическую нишу. Поэтому вероятность сохранения гибридных *Nif*<sup>-</sup>-форм этих бактерий в ткани растения больше, чем в случае эрвиний. Однако не исключена возможность их реверсии к дикому типу и вытеснения более приспособленными ревертантами.

В лабораторных условиях при пассировании *Nif*<sup>+</sup>-производных ксантомонаса в ткани дисков корнеплодов свеклы обнаружено появление ревертантов среди изолятов из инфицированной ткани свеклы после 1—2 пассажей через ткань с частотой 1 клетка на 200 клеток с *Nif*-фенотипом. На протяжении четырех пассажей количество ревертантов возрастало до соотношения 1 : 10 и в дальнейших пассажах не изменялось. Несмотря на сокращение количества *Nif*<sup>+</sup>-клеток ксантомонаса, ацетиленредуктазная активность тканей корнеплода свеклы изменялась незначительно (табл. 3).

В экспериментах на интактных растениях исследовали возможность вытеснения *Nif*<sup>+</sup>-форм ксантомонаса дикой формой или ее производными, содержащими плазмиду *R68.45* (в последнем случае исследовали еще и динамику распространения плазмиды при конъюгации бактерий *in planta*). Для этих целей использовали инокуляционные смеси бактерий, как указывалось выше. В течение трех месяцев (май—июнь) исходное соотношение клеток исследуемых культур сохранялось (проверки производили через каждые 14 дней), а в некоторых случаях наблюдали тенденцию к увеличению количества *Nif*<sup>+</sup>-клеток в корнеплодах свеклы. Через четыре месяца после инокуляции растений смесью культур изолировали лишь производные ксантомонаса, утратившие *Nif*-фенотип. Это было выявлено в тех экспериментах, где исследовали смесь *Nif*<sup>+</sup>-формы ксантомонаса с производными, имеющими плазмиду *R68.45*. 100 % изолированных клеток имели *Nif*<sup>-</sup>*Km*<sup>r</sup>*Tc*<sup>r</sup>-фенотип, т. е. все клетки *Nif*<sup>+</sup>-формы ксантомонаса получили плазмиду *R68.45* в результате конъюгации *in planta*. Возможно, это и явилось причиной потери *Nif*-фенотипа, так как в лабораторных условиях была получена репрессия *nif*-генов при введении в клетки ксантомонаса *R68.45* традиционными методами конъюгации.

Таким образом, модельные эксперименты по выяснению возможности функционирования *nif*-генов *K. pneumoniae*, а также их генетической стабильности у гибридных форм бактерий *E. aroidae* и *X. beticola* в условиях развития последних в тканях растения-хозяина, т. е. приближенных к естественным, показали, что у этих гибридов наблюдается

экспрессия *nif*-генов при развитии *in planta*; *nif*-гены наследуются при этом на протяжении длительного периода времени; гибридные формы эрвиний и ксантомоноса занимают соответствующую экологическую нишу на хозяйском растении; при развитии *in planta* *Nif*<sup>+</sup>-формы ксантомоноса успешно конкурируют с *Nif*<sup>-</sup>-формами.

В результате проведенной работы экспериментально обосновано теоретически сформулированное нами ранее новое направление — создание не существовавших ранее азотфиксирующих организмов, способных развиваться в небобовых растениях и усваивать при этом свободный азот атмосферы. Эта работа позволила уточнить выполнимость тех обязательных требований к новым азотфиксаторам, без которых выбранный путь не мог бы выйти за пределы только теоретических изысканий, а также указать на те методические подходы, которые для этого необходимо использовать.

Первое по значимости требование сводится к устойчивости *Nif*-фенотипа, так как в противном случае вся работа остановится на первом же этапе. Ему полностью удовлетворяет получение форм, у которых *nif*-гены транспозированы в хромосому. Для этого очень удачной оказалась плаزمид *pRD1*.

Второе требование сводится к обязательной конкурентоспособности получаемых азотфиксирующих производных по отношению к диким аналогичным видам. Невыполнение этого требования в свое время явилось причиной невозможности использования многих бактериальных удобрений. В проведенных работах было показано, что стабильные по *Nif*-фенотипу формы ксантомоноса успешно конкурировали с дикой формой в растительной ткани и в этом случае на протяжении почти всего вегетационного периода вытеснения не происходило — в растениях длительно существовала равновесная популяция.

Третье требование диктует необходимость высокого уровня азотфиксации у получаемых форм не только на питательных средах, но и в растении. Прямые замесы ацетиленредукции показали, что искусственные производные фитопатогенных бактерий и в чистой культуре, и при инокуляции растений по данному показателю количественно превосходят донорные штаммы.

Наконец, четвертое требование касается проблемы кислородной защиты. Для искусственно получаемых азотфиксаторов предпочтительно найти такое решение, при котором сами бактерии берут на себя защиту нитрогеназы от кислорода. Оказалось, что по крайней мере некоторые бактерии, развивающиеся в растениях, потенциально несут такую функцию. И хотя до получения нового класса азотфиксаторов практической значимости предстает еще большой и нелегкий путь, проведенная работа показывает его принципиальную выполнимость.

#### THE THEORETICAL BASIS AND EXPERIMENTAL CONSTRUCTION OF NEW-TYPE NITROGEN FIXERS ABLE TO GROW AND FIX THE ATMOSPHERIC NITROGEN IN NONLEGUMES

V. A. Kordyum, N. A. Kozyrovskaia, N. V. Gunkovskaya

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

A new trend in the biological nitrogen fixation, the construction of the nitrogen-fixing derivatives of bacteria able to grow in nonlegumes has been theoretically and experimentally substantiated.

1. Stewart W. D. P. Nitrogen fixation — its current relevance and future potential // *Isr. J. Bot.* — 1983. — 32, N 1. — P. 5—44.
2. Баяв А. А., Злотников К. М. Биологическая фиксация азота и генетическая инженерия // *Биотехнология*. — М.: Наука, 1984. — С. 217—223.

3. Paul E. A. Contribution of nitrogen fixation to ecosystem functioning and nitrogen fluxes on a global basis // *Ecol. Bull.* — 1978. — N 26. — P. 282—293.
4. Кордюм В. А. Биологическая азотфиксация. Проблемы и перспективы // Молекуляр. биология. — 1982. — Вып. 30. — С. 45—57.
5. Eita S. W., Anderson M. A., Brill W. J. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation // *Plant Physiol.* — 1982. — 70, N 5. — P. 1564—1567.
6. Iyama S., Sano Y., Fujii T. Diallel analysis of nitrogen fixation in the rhizosphere of rice // *Plant Sci. Lett.* — 1983. — 30, N 2. — P. 129—135.
7. Balandreau J. Microbiology of the association // *Can. J. Microbiol.* — 1983. — 29, N 8. — P. 851—859.
8. Vose P. B. Developments in nonlegume N<sub>2</sub>-fixing systems // *Ibid.* — P. 837—850.
9. Ishac Y. Z., El-Borollosy M. A., Refaat A. A. Nitrogen fixing microorganisms in the phyllosphere of some crop plants in Egypt // *Soil Biol. and Conserv. Biosphere.* — 1984. — 2. — P. 541—553.
10. Schroth M. N., Hancock J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria // *Science.* — 1982. — 216, N 4553. — P. 1376—1381.
11. Klingmüller W. Genetic engineering for practical application // *Naturwissenschaften.* — 1979. — N 66. — P. 182—189.
12. Kleeberger A., Klingmüller W. Plasmid-mediated transfer of nitrogen-fixing capability to bacteria from the rhizosphere of grasses // *Mol. and Gen. Genet.* — 1980. — 180, N 3. — P. 621—627.
13. Chen J., Ye Z. Transfer and expression of *Klebsiella nif* genes in *Alcaligenes faecalis*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice root // *Plasmid.* — 1983. — 10, N 3. — P. 290—292.
14. Patriquin D. G., Döbereiner J., Lain D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses // *Can. J. Microbiol.* — 1983. — 29, N 8. — P. 900—915.
15. Перенос маркеров плазмиды *pRDI* в *Xanthomonas beticola* // В. А. Кордюм, Н. А. Козыровская, Р. И. Гвоздяк, В. А. Мурац // Докл. АН УССР. — Сер. Б. — 1980. — № 5. — С. 82—85.
16. *Rhizobium meliloti* nodulation genes allow *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* to form pseudonodules on alfalfa / A. M. Hirsh, K. J. Wilson, J. D. G. Jones et al. // *J. Bacteriol.* — 1984. — 158, N 3. — P. 1133—1143.
17. Heat curing of a Sym plasmid in a fast-growing *Rhizobium sp.* that is able to nodulate legumes and nonlegume *Parasponia sp.* / N. A. Morrison, Y. Ha Ceh, M. J. Trinick et al. // *Ibid.* — 1983. — 153, N 1. — P. 527—531.
18. Silver W. S., Centifanto G. M., Nicolas D. J. D. Nitrogen fixation by the leaf-nodule endophyte of *Psychotria bacteriophyta* // *Nature.* — 1963. — 199, N 4675. — P. 396—397.
19. Taboada J., Herrera T. Efecto de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno por *Agrobacterium azotophilum* // *An. Inst. biol. Univ. nac. autón. Méx. Ser.-Biol. exp.* — 1972. — 43, N 1. — P. 35—42.
20. Papen H., Werner D. N<sub>2</sub>-fixation in *Erwinia herbicola* // *Arch. Microbiol.* — 1979. — 120, N 1. — P. 25—30.
21. Serological and immunoelectrophoretic relationships between *Rhizobium* and *Agrobacterium* strains / M. A. Abd-El-Rehim, A. S. Abdel-Ghaffar, F. Kreeman, W. N. Gobrial // *Egypt. J. Soil Sci.* — 1975. — Spec. issue. — P. 471—476.
22. Perombelon M. C. M., Boucher C. Developing a mating system in *Erwinia carotovora* // *Proc. 4th int. conf. plant pathog. bact.* — Angers, 1978. — V. 1. — P. 47—52.
23. Boistard P., Boucher C. *P1* group plasmids as tool for genetic study of phytopathogenic bacteria // *Ibid.* — P. 17—30.
24. Zaenen J., van Zarebeke N., Teuchy H. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains // *J. Mol. Biol.* — 1974. — 86, N 1. — P. 109—127.
25. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown-gall tumorigenesis / M. D. Chilton, M. H. Drummond, D. J. Merlo et al. // *Cell.* — 1979. — N 11. — P. 263—271.
26. Chatterjee A., Starr M. *Erwinia spp.* and other *Enterobacteriaceae* carried on *R* factors // *J. Bacteriol.* — 1972. — 112, N 3. — P. 576—578.
27. Coplin D. L., Rowan R. C. Conjugative plasmids in *Erwinia stewartii* // *Proc. 4th int. conf. plant pathog. bact.* — Angers, 1978. — V. 1. — P. 67—73.
28. Sparks R. B., Lacy G. H. Purification and characterization of cryptic plasmids *pLS1* and *pLS2* from *Erwinia chrysanthemi* // *Phytopathology.* — 1980. — 70, N 5. — P. 369—372.
29. Неборачко Л. Н., Гвоздяк Р. И., Кордюм В. А. Экспрессия гетерологичных плазмид в *Erwinia carotovora* // Докл. АН СССР. — 1982. — 264, № 5. — С. 1242—1245.
30. Haas D., Holloway B. W. *R*-factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol. and Gen. Genet.* — 1976. — 144, N 3. — P. 243—248.
31. Hendrick C. A., Haskins W. P., Vidaver A. K. Conjugative plasmid in *Corynebacterium flaccumfaciens subsp. oortii* that confers resistance to arsenite, arsenate and antimony (III) // *Appl. and Environ. Microbiol.* — 1984. — 48, N 1. — P. 56—60.
32. Transfer, mapping and cloning of *Pseudomonas syringae pv. syringae* plasmid *pCG131* and assessment of its role in virulence / C. F. Gonzales, S. K. Layfer, A. K. Vidaver, R. H. Olsen // *Phytopathology.* — 1984. — 74, N 10. — P. 1245—1250.
33. Construction of a genomic library of *Erwinia chrysanthemi* and molecular cloning of cellulase gene / F. Barras, M. H. Boyer, J. P. Chambost et al. // *Mol. and Gen. Genet.* — 1984. — 197, N 3. — P. 513—515.
34. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their ex-

- pression in *Escherichia coli* / N. T. Keen, D. Dahlbeck, B. Staskawicz et al. // J. Bacteriol. — 1984.—159, N 3. — P. 825—831.
35. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase / A. Collmer, C. Shoedel, D. L. Roeder et al. // Ibid. — 1985.—161, N 3. — P. 913—920.
  36. Van Gysegem F., Toussaint A., Schoonejans E. In vivo cloning of the pectate lyase and cellulase genes of *Erwinia chrysanthemi* // The EMBO J. — 1985.—4, N 3.— P. 787—792.
  37. Molecular cloning of *Erwinia chrysanthemi* pectinase and cellulase structural genes / A. Hotoujansky, A. Dioloz, M. Boccara et al. // Ibid. — P. 781—785.
  38. Cloning of the pectate lyase genes from *Erwinia carotovora* and their expression in *Escherichia coli* / S.-P. Lei, H.-C. Lin, L. Hoffmann et al. // Gene. — 1985.—35, N 1—2. — P. 63—70.
  39. Link R. T., Chatterjee A. K. Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Appl. and Environ. Microbiol.— 1985.—49, N 3. — P. 714—717.
  40. Reverchon S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Bandoy J. Cloning of genes encoding pectolytic enzymes from a genomic library of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* // Gene. — 1985.—35, N 1—2. — P. 121—130.
  41. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1 / M. J. Daniels, C. E. Barber, P. C. Turner et al. // The EMBO J. — 1984.—3, N 13. — P. 3323—3328.
  42. Turner P., Barber C., Daniels M. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Mol. and Gen. Genet. — 1985.—199, N 2. — P. 338—344.
  43. Ehrenshaft M., Mills D. Construction of a cosmid clone library of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and isolation of genes by functional complementation // Appl. and Environ. Microbiol. — 1985.—50, N 1. — P. 169—171.
  44. Лобанок Т. Е., Песнякевич А. Г., Фомичев Ю. К. Восприятие и передача плазмиды Rts бактериями рода *Erwinia* // Генетика. — 1979.—15, № 10. — С. 1739—1745.
  45. Mington L., Panopoulos N. J., Shaffer S. Transmission of R plasmids among *Xanthomonas* spp. and other plant pathogenic bacteria // Phytopathology. — 1977.—67, N 8. — P. 1044—1050.
  46. Cannon F. C., Dixon R. A., Postgate J. R. Derivation and properties of F-prime factors in *Escherichia coli* carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae* // J. Gen. Microbiol. — 1976.—93, N 1. — P. 111—125.
  47. Postgate J. R., Krishnapillai V. Expression of *Klebsiella nif* and *his* genes in *Salmonella typhimurium* // Ibid. — 1977.—98, N 2. — P. 379—385.
  48. Dixon R. A., Cannon F. C., Kondorosi A. Construction of P-plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae* // Nature. — 1976.—260, N 5548. — P. 268—271.
  49. Козыровская Н. А., Кордюм В. А. Влияние плазмиды pRD1 на свойства фитопатогенных бактерий // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. — 1983.— № 5. — С. 35—38.
  50. Changes in properties of phytopathogenic bacteria affected by plasmid pRD1 / N. A. Kozыrovskaya, R. I. Gvozdyak, V. A. Muras, V. A. Kordyum // Arch. Mikrobiol. — 1984.—137, N 4. — P. 338—343.
  51. Кордюм В. А., Козыровская Н. А. Особенности экспрессии генов азотфиксации (*nif*) у экзонъюганта *Xanthomonas belicola* // Рекомбинантные плазмиды: Тез. докл. все-союз. конф. — Пушкино, 1982. — С. 67.
  52. Spontaneous degradation of pRD1 DNA into unique size classes is *rec A* dependent / A. Pühler, H. J. Burckhardt, F. C. Cannon, W. Wohlleben // Mol. and Gen. Genet. — 1979.—171, N 1. — P. 1—6.
  53. Придание способности фиксировать азот атмосферы бактериям *Erwinia aroideae* / В. А. Кордюм, Н. А. Козыровская, Р. И. Гвоздык, С. Ф. Ходос // Докл. АН СССР. — 1983.—271, № 1. — С. 206—210.
  54. Farrand S. K., Kado C. J., Ireland C. R. Suppression of tumorigenicity by *Inc WR* plasmid pSa in *Agrobacterium tumefaciens* // Mol. and Gen. Genet. — 1981.—181, N 1. — P. 44—51.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР

Получено 17.01.86