



УДК 575.1:599.323.4

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ И ИХ ПЕРЕНОС В ЖИВОТНЫЕ КЛЕТКИ

Н. Н. Кузнецова, Ф. С. Мухамедханова,
С. С. Нуридджаниянц, А. А. Абдукаримов, А. С. Садыков

Введение. Развитие резистентности к химическим агентам, блокирующим ферментные системы, связано чаще всего с амплификацией гена фермента-мишени, приводящей к его гиперпродукции. Специфическая амплификация генов обнаружена в клетках, устойчивых к метотрексату [1], актиномицину Д [2], пиразофурину и 6-азауридину [3], гидроксимочевине [4], α -метилорнитину [5] и некоторым другим агентам. Морфологически амплификация проявляется в виде хромосом с гомогенно окрашенными областями (ГОО) либо образованием двойных минихромосом (ДМ) и мелких хроматиновых образований [6–8]. С помощью гибридизации *in situ* радиоактивных специфических проб с ДНК на хромосомах доказано, что ГОО в резистентных клетках действительно является местом локализации амплифицированных генов [6].

В качестве моделей для изучения лекарственной устойчивости к метотрексату (МТК) широкое применение нашли линии и сублинии клеток китайского хомячка, различающиеся по своему гистогенезу и имеющие стабильный и удобный для анализа кариотип [1, 6]. В таких клетках развитие резистентности к МТК сопровождается появлением хромосом с ГОО, локализованными на одной из двух хромосом второй пары, являющейся естественным местом расположения гена фермента-мишени дигидрофолатредуктазы (ДФР) [6, 7].

В резистентных клетках китайского хомячка при наличии большого количества индивидуальных стабильных хромосомных маркеров, в том числе и во второй паре, наличие ГОО приносит в кариотип известную нестабильность в характере расположения и перераспределения амплифицированных участков на хромосомах [9].

Выяснение закономерностей образования и поведения ГОО в новой резистентной клеточной линии китайского хомячка *BFF^{R3}*, выведенной нами, а также перенос генов ДФР в чувствительные к МТК клетки являются задачей и предметом обсуждения настоящей работы.

Материалы и методы. Клеточные линии. В работе использована линия фибробластоподобных клеток китайского хомячка *Bld-ii-FAF28* (клон 431) [10, 11]. Клетки культивировали в смешанной питательной среде Игла и среде 199 (1:1) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС).

Резистентная клеточная линия *BFF^{R3}* на основе вышеуказанного клона клеток росла в тех же условиях с добавлением 132 мкг/мл МТК.

В качестве реципиентной по переносу генов ДФР была использована культура суспензионных клеток линии *FStk⁻*, выращиваемая в среде RPMI 1640 с 10 % ЭТС и 1 % глутамина.

Получение сублиний клеток, резистентных к МТК. Резистентные сублинии получены путем последовательного культивирования клеток в ростовой среде, содержащей возрастающие концентрации МТК: 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,4; 0,8; 1; 4;

10; 50; 200 и 300 мкМ. Сублинией считали клетки, прошедшие два пассажа при новой дозе препарата.

Кариотипический анализ. Метафазные пластинки исследуемых клеток приготовлены по методу, использованному в работе [12].

Метод дифференциальной окраски для выявления G-полос и анализ хромосомных препаратов описаны ранее [13]. При рассмотрении дифференциально окрашенных хромосом сравнивали кариотипы резистентных и нормальных клеток китайского хомячка [14], при этом все хромосомы делили на нормальные и маркерные (M). Анализируя распределения клеток с разным числом хромосом, учитывали 100 метафазных пластинок в каждом варианте, а при анализе дифференциально окрашенных хромосом — 15.

Трансфекция и селекция. Для трансформации *FStk*-клеток дигидрофолатредуктазным геном из *BFFR³*-клеток использовали метод копреципитации ДНК с помощью фосфата кальция [15]. Трансфекцию проводили, как указано в работе [16], с небольшими изменениями. Выделение ДНК для трансфекции проводили согласно [17]. Перед трансфекцией суспензионной культуры *FStk*- $5 \cdot 10^5$ клеток, находящихся в логарифмической фазе роста, переносили в пластиковые чашки диаметром 100 мм в 5 мл среды ДМЕМ с 1 % ЭТС и инкубировали 1 ч в термостате с 5 % CO_2 для прикрепления клеток и выравнивания pH среды.

Для образования Са-фосфатного преципитата к 40 мкг ДНК в 500 мкл $2 \times \text{X}$ HEPES-буферного раствора (280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 1,5 мМ Na_2HPO_4 , 2 г/л декстрозы, 42 мМ HEPES, pH 6,7) по каплям добавляли 50 мкл CaCl_2 , 2,5 М. Объем преципитата доводили H_2O до 1 мл. Сформированный преципитат осторожно по каплям вносили в среду, покрывающую клетки. Клетки с преципитатом инкубировали 4–5 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5 % CO_2 . Затем среду удаляли, клетки обрабатывали 1 мин 20 %-ным раствором глицерина на трис-буфере (0,1 г MgCl_2 , 0,1 г CaCl_2 , 8 г NaCl, 0,38 г KCl, 0,1 г Na_2HPO_4 , 3 г трис на 1 л, pH 7,5), промывали трис-буфером и заливали ростовой средой ДМЕМ, содержащей 10 % ЭТС. После трансфекции клетки культивировали в этой среде 48 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе.

Селективное клонирование клеток проводили в полужидком агаре («Difco», США) в пластмассовых чашках Петри диаметром 100 мм. Для этого $(5\text{--}10) \cdot 10^6$ трансфицированных клеток суспендировали в 10 мл агаризованной среды MEM, содержащей $8 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл МТК. Такую суспензию наносили на подложку из 10 мл селективной агаризованной среды с 0,5 % агара. Подкормку клеток проводили на 6–7-й день, добавляя свежую селективную среду с 0,35 % агара. Подсчет колоний проводили на 12–14-й день роста в селективных условиях.

Результаты и обсуждение. Селекция и выведение МТК-устойчивых клеток китайского хомячка. На первом этапе селекции МТК-устойчивых вариантов клетки китайского хомячка линии *Bld-ii-FAF28* (клон 431) рассеивали по $1 \cdot 10^5$ во флаконы с питательной средой, содержащей $4,5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл МТК (0,01 мкМ). Через две недели были обнаружены колонии ($4 \cdot 10^{-5}$ клеток), давшие начало хорошо размножающейся при данной дозе МТК сублинии клеток. Последовательным культивированием клеток в среде, содержащей возрастающие концентрации препарата от 0,01 до 300 мкМ, были получены различные сублинии резистентных клеток. Степень устойчивости полученных сублиний к МТК определяли, сравнивая их выживаемость с выживаемостью исходных чувствительных клеток в среде, содержащей различные концентрации МТК. Для резистентной сублинии *BFFR³* доза МТК, снижающая количество выросших колоний на 50 % (ED_{50}), равнялась 150 мкг/мл.

Стабильность наследования устойчивости к МТК была изучена при культивировании клеток в неселективных условиях. При этом в сублинии *BFFR³* МТК-устойчивость сохранялась в течение длительного времени (более года наблюдений).

Морфологический анализ клеточных линий. Морфологическое исследование клеточной линии *Bld-ii-FAF28* (клон 431) показало, что клетки имеют веретеновидную форму с тенденцией роста, средней между фибробластоподобной и эпителиоидной (рис. 1), характерной для данного клона клеток [11]. На ранних этапах селекции токсическое действие МТК проявлялось в активном отмирании клеток

и изменении их морфологии. Клетки приобретали полигональную форму с древовидно ветвящимися отростками и имели сильно вакуолизованную цитоплазму. Выжившие клетки морфологически сохраняли

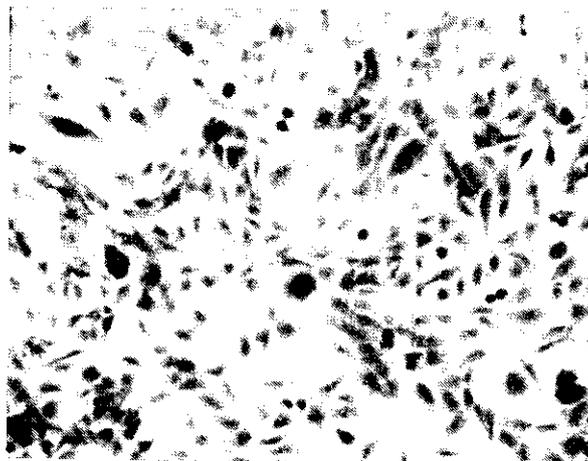


Рис. 1. Морфология клеток линии китайского хомячка *Bld-ii-FAF28* (клон 431). Эпителиоидно-фибробластоподобный тип роста

Fig. 1. Morphology of Chinese hamster cells of *Bld-ii-FAF28* line (431 clone). Epithelial-fibroblast-like type of growth

исходный вид и давали начало хорошо размножающейся популяции. На этом этапе концентрация МТК повышалась.

Резистентные клетки линии *BFFR³*, растущие в среде с МТК, 132 мкг/мл, морфологически отличались от чувствительных — среди ос-

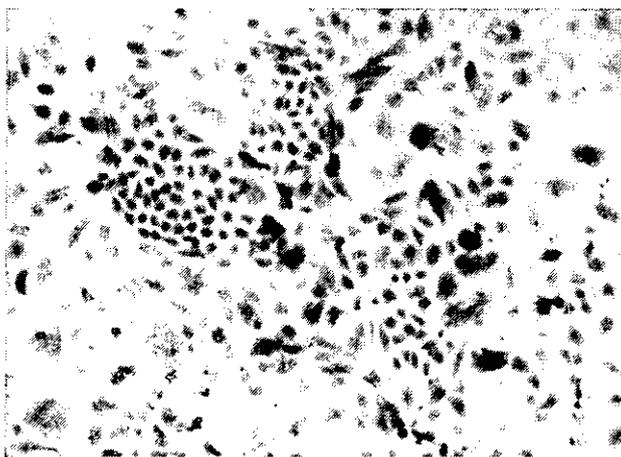


Рис. 2. Морфология резистентных клеток линии *BFFR³*. Среди основной популяции видны островки мелких интенсивно красящихся клеток

Fig. 2. Morphology of resistant cells of the *BFFR³* line. Among the main population the spots of little intensively colouring cells are seen

новной популяции появлялись островки мелких интенсивно красящихся клеток (рис. 2).

Хромосомный анализ. В кариотипе использованных в работе клеток линии *Bld-ii-FAF28* (клон 431) стволовую линию (модальный класс) составляли клетки (23 %) с 21 хромосомой ($2n=21$). Кариотипы этих клеток состояли из девяти больших, средних и малых метацентрических, десяти субтелоцентрических и двух телоцентрических

хромосом, характерных для клеток китайского хомячка этого клона [11]. Имеется несколько боковых линий с 20, 22, 23 и 24 хромосомами в 15, 16, 8 и 13 % клеток соответственно.

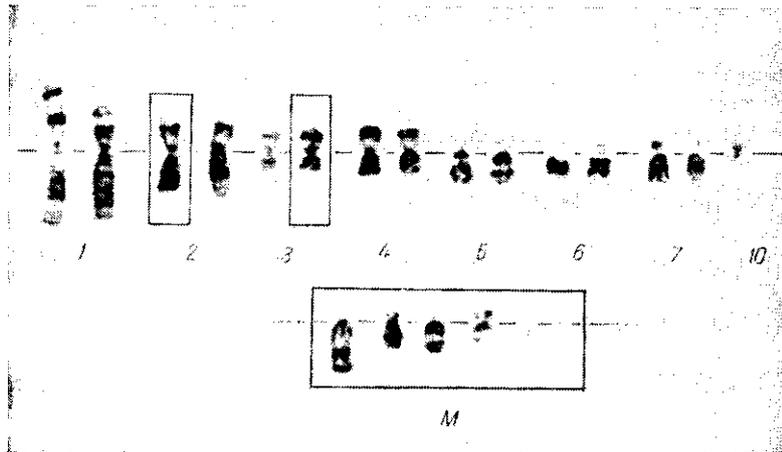


Рис. 3. Кариотип клетки модального класса линии *Bld-ii-FAF28* (клон 431)

Fig. 3. Cell karyotype of the modal *Bld-ii-FAF28* (431 clone) line class

Дифференциальное окрашивание для выявления G-полос позволило идентифицировать пары хромосом, что впервые проведено для клеток китайского хомячка этой линии. В кариотипе клеток, кроме 13 нормальных хромосом, обнаружено 8 маркерных (*M*) (рис. 3).

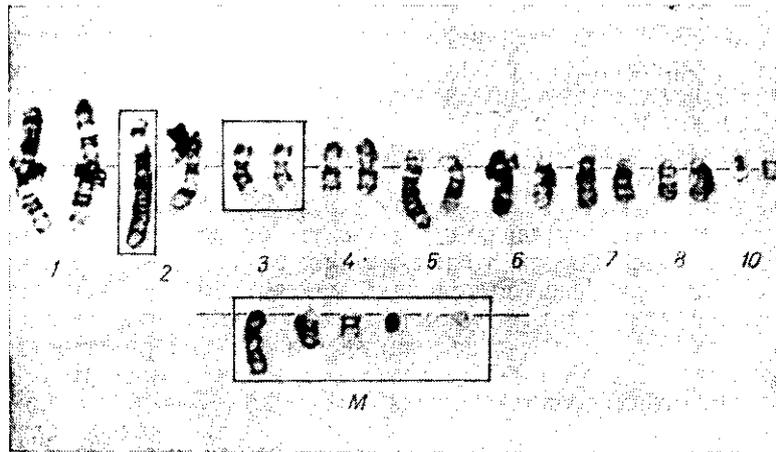


Рис. 4. Кариотип клетки модального класса сублинии *BFFR3*. Имеется дополнительный материал на длинных плечах хромосом 2 и 5

Fig. 4. Cell karyotype of the modal *BFFR3* subline class. There is an additional material at long arms of chromosomes 2 and 5

При хромосомном анализе клеток резистентных сублиний установлено, что кариотипы претерпевают специфические изменения в процессе культивирования. В резистентных клетках *BFFR3* стволовую линию (модальный класс) составили клетки (40 %) с 24 хромосомами ($2n=24$). Боковые линии представлены клетками, содержащими 22, 23 и 25 хромосом, в 12, 14, 11 % клеток соответственно. В резистентных клетках обнаружены различные структурные варианты маркерных хромосом. Наиболее часто (в 80 % клеток) встречалась самая крупная в кариотипе субметацентрическая хромосома, одна или две на кариотип (рис. 4). Реже, приблизительно в 5 % клеток, обнаружена крупная

субтелоцентрическая хромосома (рис. 5), имеющая транслоцированные участки других хромосом. Наряду с маркерными хромосомами в небольшом количестве клеток найдены единичные «двойные» минихромосомы, которые впоследствии элиминировались из клеток.

При дифференциальном окрашивании на G-полосы в кариотипе клеток линии *BFFR3* при модальном числе хромосом обнаружено 8 маркерных хромосом (M-8, рис. 4). Среди них упомянутая выше крупная субметацентрическая хромосома, в которой верхнее плечо и проксимальная часть нижнего плеча соответствовали хромосоме 2, а остальную часть длинного плеча занимала ГОО. Часто встречались различные структурные варианты хромосомы 2, в которых на длинное плечо с ГОО транслоцировались участки других хромосом (рис. 6).



При повторных исследованиях высокорезистент-

ной сублинии *BFFR3*, проведенных на более поздних пассажах культивирования в селективной среде, ГОО обнаружены не только на хромосоме 2, но и на других хромосомах набора (рис. 5). Число клеток, имеющих две хромосомы с ГОО, не превышало 3%. Размер ГОО варьировал от клетки к клетке, общая длина ГОО достигала 6% и выше всей длины хромосом клетки.

Рис. 5. Метафазная пластинка клетки сублинии *BFFR3*. Стрелкой указана крупная aberrантная субтелоцентрическая хромосома

Fig. 5. Metaphase plate of *BFFR3* subline cell. Large aberrant subtelocentric chromosome is pointed by arrow

Перенос МТК-устойчивости в *FStk*-клетки. Генетическая трансформация происходит с низкой частотой и обычно обнаруживается по способности трансформированных клеток расти в селективных условиях. Для выяснения компетентности реципиентных клеток к трансформации и их чувствительности к селекции была исследована клонируемость клеток в полужидком агаре при различных дозах МТК. При дозах $5 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл, а также в отсутствие препарата наблюдалось массовое появление колоний. При дозах $2,5 \cdot 10^{-2}$ и $5 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл обнаружено 50 и 2 колонии соответственно. Клетки не росли в агаре, содержащем $8 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл. Таким образом, эта концентрация МТК была выбрана для селекции *FStk*-клеток, трансфицированных кальциевыми преципитатами ДНК из клеток сублинии *BFFR3*. Трансформанты обнаружены на 10—14-й день роста в селективных условиях с частотой $1,04 \cdot 10^{-6}$ (3—5 колоний на чашку).

Одновременно была проверена вероятность появления МТК-устойчивых вариантов при обработке *FStk*-клеток кальциевыми преципитатами ДНК чувствительных к МТК клеток линий *Bld-ii-FAF28* и *FStk*, что одновременно явилось и контролем на передачу резистентности клеткам. Такая обработка не привела к появлению *FStk*-резистентных колоний в селективных условиях.

Способность индуцировать МТК-резистентность в чувствительных клетках означает перенос амплифицированных генов ДГФР резистентных к препарату клеток.

В настоящей работе описана новая сублиния клеток китайского хомячка *BFFR3*, резистентная к 132 мкг/мл МТК. Так же, как и в ра-

нее выведенной сублинии $BFFR^1$, резистентной к 91 мкг/мл препарата [12], в исследуемой сублинии обнаружены кариотипические изменения — образование ГОО на хромосоме 2, появление транзитных ДМ-элементов и дицентрических маркеров с ГОО, транслокаций ГОО на другие хромосомы набора и как следствие этого — дестабилизация кариотипа.

Как известно, ГОО являются участками амплифицированных генов ДГФР, обуславливающих развитие лекарственной устойчивости [6]. В клетках сублинии $BFFR^3$ обнаруживается образование ГОО не толь-



Рис. 6. Структурный вариант хромосомы 2 с ГОО (указано стрелкой) клетки сублинии $BFFR^3$ с прилегающими транслоцированными участками

Fig. 6. Structural variant of chromosome 2 with HSR (pointed by arrow) of the $BFFR^3$ subline cell with adjacent translocated regions

ко на хромосоме 2, но и на хромосоме 5. Так, в геноме клеток китайского хомячка линии СНО по меньшей мере два участка, имеющих различную локализацию, содержат последовательности, гомологичные гену ДГФР [17]. Образование второй ГОО в МТК-устойчивых клетках сублинии $BFFR^3$, возможно, связано с тем, что в этом участке исходно расположена другая копия гена ДГФР или это явление — результат транслокаций ГОО с хромосомы 2 на другие хромосомы набора. Обнаруженные изменения морфологии хромосом резистентных клеток позволяют полагать, что в клетках с ГОО постоянно идут различные хромосомные перестройки, ведущие к дестабилизации кариотипа и соответственно — изменчивости генома. Развитие резистентности к МТК в клетках китайского хомячка сублинии $BFFR^3$ сопровождалось изменениями не только морфологии, но и числа хромосом большой группы клеток, определяющей модальный класс сублинии. В изучаемой сублинии резистентных клеток $BFFR^3$ селективные преимущества приобрели клетки с 24 хромосомами (40 % клеток). Вероятно, повышение уровня устойчивости клеток приводит к замене модального класса хромосом для данной популяции клеток. В цитогенетических работах по изучению лекарственной резистентности основное внимание, как правило, обращают на морфологические изменения кариотипа, не уделяя внимания анализу распределений и изменений хромосомных чисел в группах клеточной популяции. Так, в описанной Копниным [18] сублинии колхициностойчивых клеток джунгарского хомячка обнаружена дополнительная хромосома 2 с ГОО, которая в популяции исходных клеток присутствует в 1 % клеток [19]. Интерпретируя эти данные, можно кос-

венно предположить, что под действием препарата селективные преимущества приобретают клетки с определенными генотипическими признаками.

Фенотипическим проявлением таких генетических преобразований кариотипа клеток сублинии BFF^{R3} , возможно, является наблюдаемое нами изменение морфологии и характера роста клеток, т. е. появление среди обычных фибробластоподобных клеток основной популяции очагов мелких интенсивно красящихся круглых клеток. Замена модального класса в резистентных сублиниях говорит о том, что противоопухолевые препараты селективируют варианты, которые помимо устойчивости характеризуются повышенной нестабильностью кариотипических перестроек, что создает реальную основу для возникновения новых устойчивых вариантов.

Аmplифицированное состояние гена ДГФР в МТК-резистентных клетках сублинии BFF^{R3} подтверждается не только обнаружением в кариотипе специфических хромосомных маркеров с ГОО, но и фактом переноса высокоочищенной ДНК резистентных клеток в чувствительные $FStk^-$ -клетки путем трансфекции и появлением колоний, растущих при значительно меньших дозах препарата в ростовой среде, чем клетки донора. Все это отрицает гипотетически возможную доминантную мутацию гена ДГФР в клетках сублинии BFF^{R3} , при которой трансформированные клетки с приобретением гена приобретают и присущий резистентным клеткам высокий уровень лекарственной устойчивости [19].

AMPLIFICATION OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE GENES AND THEIR TRANSFER TO ANIMAL CELLS

*N. N. Kuznetsova, F. S. Mukhamedkhanova,
S. S. Nuridzhanyants, A. A. Abdukarimov, A. S. Sadykov*

Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

Summary

A new subline of Chinese hamster cells BFF^{R3} , derived from fibroblast-like cell line *Bld-ii-FAF28* (431 clone), and resistant to 132 $\mu\text{g/ml}$ of metotrexate (mtx) has been described.

Karyotype study has revealed the specific changes in resistant cells in the form of homogeneously stained within chromosomes 2 and 5, and at the same time single double minute chromosomes being amplified dihydrofolate reductase genes. Variation in the modal class of resistant cells is found in the process of selection, the cells with 24 chromosomes (40 %) being dominated.

The transfer of drug resistance has been performed while treating mtx-sensitive $FStk^-$ cells with DNA, isolated from resistant BFF^{R3} cells and the formation of colonies with low frequency ($1.04 \cdot 10^{-6}$) has been shown.

Thus, the amplification of target-genes under action of mtx underlies variability of cell population.

1. Biedler J. L., Spengler B. A. Quantitative relationship between a chromosome abnormality (HSP) and antifolate resistance associated with enzyme overproduction // *J. Cell. Biol.*—1976.—70, N 2.—P. 117a.
2. Связь резистентности клеток млекопитающих к актиномицину Д с изменением кариотипа и уменьшением проницаемости цитоплазматической мембраны / Ю. С. Масинно, Е. С. Какпакова, Б. П. Копнин, Е. Е. Погосянц // *Генетика.*—1981.—17, № 7.—С. 1253—1258.
3. Suttle D. P., Stark G. R. Coordinate overproduction of orotate phosphoribosyltransferase and orotidin-5-phosphate decarboxylase in hamster cells resistant to pyrasofurin and 6-azauridine // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 11.—P. 4602—4607.
4. Lewis W. H., Kuzin B. A., Wright G. A. Assay of ribonucleotide reduction in nucleotide-permeable hamster cells // *J. Cell. Physiol.*—1978.—94, N 3.—P. 287—298.
5. Initial characterization of a M. T. G. cell variant partially resistant to antiproliferation effect of ornithine decarboxylase inhibitors / P. S. Mamont, M.-C. Duchesne, J. Glove, C. Tardif // *Exp. Cell Res.*—1978.—115, N 2.—P. 387—393.

6. *Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome, a methotrexate-resistance chinese hamster ovary cell line* / J. H. Nunberg, R. J. Kaufman, R. T. Schimke et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1978.—75, N 11.— P. 5553—5556.
7. *Kaufman R. J., Brown P. C., Schimke R. T. Amplified dihydrofolate reductase genes in instably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes* // Ibid.— 1979.—76, N 11.— P. 5669—5673.
8. *Копнин Б. П., Гудков А. В. Амплификация участков генома в соматических клетках млекопитающих, устойчивых к колхицину. Сообщение III. Локализация амплифицированных генов в мелких хроматиновых образованиях* // Генетика.— 1982.—13, № 10.— С. 1683—1692.
9. *Gene amplification as a mechanism for drug resistance in cultured animal cells* / C. C. Simonsen, P. C. Brown, G. F. Crouse et al. // Mol. basis drug action. proc. int. symp. (Queretaro, Oct. 13—16, 1980).— New York, 1981.— P. 343—359.
10. *Yerganian G., Leonard M. J. Maintenance of normal in situ chromosomal features in long-term tissue cultures* // Science.— 1961.—133, N 3490.— P. 1600—1601.
11. *Chromosomal variability in clonal populations of a chinese hamster cell strain* / A. F. Zakharov, E. S. Kakpakova, N. A. Egolina, H. E. Pogozianz // J. Nat. Can. Inst.— 1964.—33, N 5.— P. 935—949.
12. *Deaven L. L., Peterson D. F. The chromosomes of CHO, an aneuploid chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses* // Chromosoma.— 1973.—41, N 2.— P. 129—144.
13. *Новая метотрексат-резистентная линия клеток китайского хомячка* / Н. Н. Кузнецова, Ф. С. Мухамедханова, С. С. Нуридджаниянц, В. Б. Леонтьев // Докл. АН УзССР.— 1983.— № 11.— С. 52—53.
14. *Kao F., Puck T. Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents* // J. Cell. Physiol.— 1969.—74, N 3.— P. 245—257.
15. *Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5DNA* // Virology.— 1973.—52, N 2.— P. 456—467.
16. *Van der Eb A. J., Graham F. L. Assay of transforming activity of tumor virus DNA* // Meth. Enzymol.— 1980.—65.— P. 826—830.
17. *The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into cells* / A. Pellicer, M. Wigler, R. Axel, S. Silverstein // Cell.— 1978.—14, N 1.— P. 133—141.
18. *Копнин Б. П. Специфические изменения карнотипа в клетках, резистентных к колхицину* // Генетика.— 1981.—17, № 2.— С. 308—316.
19. *Копнин Б. П., Гудков А. В. Амплификация участков генома в соматических клетках млекопитающих, устойчивых к колхицину. Сообщение IV. Генетическая трансформация с помощью амплифицированных генов из клеток джунгарского хомячка, высокорезистентных к колхицину* // Там же.— 1983.—19, № 6.— С. 864—871.

Ин-т биоорг. химии АН УзССР, Ташкент

Получено 21.01.86

УДК 576.851.155:633.31

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОГЕНИЗАЦИИ НА СИМБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ

Н. И. Новикова, Б. В. Симаров

Введение. Лизогения широко распространена среди бактерий рода *Rhizobium*. Описано лизогенное состояние и выделены умеренные фаги у клубеньковых бактерий клевера [1, 2], люцерны [3, 4], гороха [2] и фасоли [5]. Не обнаружены пока природные лизогенные штаммы клубеньковых бактерий сои, однако такие штаммы получены экспериментально при лизогенизации *R. japonicum* фагами, выделенными из почвы [6].

Известно, что при лизогенизации многие виды бактерий претерпевают лизогенные конверсии, приводящие к изменению их культурально-физиологических свойств. У ризобий лизогенная конверсия практически не изучена. Показано только, что при лизогенизации могут изменяться некоторые соматические антигены клубеньковых бактерий [7]. О влиянии же профага на симбиотические свойства этих бактерий ничего не известно. В связи с этим основной целью нашей работы было получение лизогенных вариантов у трех независимо изолированных му-