

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-

тантов нелизогенного штамма L5-30 и анализ их симбиотических свойств.

Материалы и методы. Бактерии и фаги. Для получения лизогенных вариантов использованы три мутанта нелизогенного штамма L5-30 *R. meliloti* [8]. Характеристики этих мутантов представлены в табл. 1. Мутанты были лизогенизированы гетероиммунными трансдуцирующими фагами *Rm1*, *Rm2* и *Rm3* [9]. Штаммы выращивали на полной питательной среде [12].

Таблица 1
Характеристика штаммов *R. meliloti*, использованных в работе
Properties of R. meliloti strains used

Штамм	Маркеры	Симбиотические свойства			Литературный источник
		Вирулентность	Масса растений, мг	Редукция C_2H_2 , мкМ на сосуд за 24 ч	
Д1	str-1 rif-1	+	17,5±2,55	2,6±0,73	[9]
М5	trp-5	+	12,6±1,28	1,2±0,70	[10]
М31	rap-31	±	9,5±1,22	0	[11]

Примечание. Масса инокулированных растений составляла $10,0 \pm 1,15$ мг; «+» — клубеньки крупные, розовые, хорошо образуются у всех растений; «±» — клубеньки желтые, петлиничной формы, образуются не у всех растений.

Получение лизогенных штаммов. Штамм, у которого получали лизогенные клоны, высевали в полужидком агаре на твердую питательную среду. На поверхность агара наносили капли фаголизата, содержащие 10^8 — 10^9 бляшкообразующих единиц (б. о. е.) в 1 мл. Фаголизаты получали при размножении умеренного бактериофага на том же штамме, который подвергался лизогенизации. На 4—5-й день из центра зоны лизиса отбирали выжившие клоны и рассеивали их на полную агаризованную среду. Для того чтобы избавиться от механического загрязнения бактериальной культуры фагом, отобранные штаммы подвергали не менее чем 4-кратному клошированию. Для получения независимых лизогенных клонов из каждой зоны лизиса отбирали только по одной колонии. Выделенные таким образом штаммы были тестированы на способность освобождать фаг спонтанно и под действием УФ-облучения по методике, опубликованной ранее [4].

Анализ плазмидного состава лизогенных культур проводили по методу Кассе — Бирибойма с модификациями [13]. В качестве контроля использовали штамм 41, несущий плазмиду *R68.45*.

Симбиотические свойства лизогенных штаммов определяли в условиях стерильного микровегетационного опыта [11, 14]. О симбиотической эффективности штаммов судили по массе высушенных растений; об азотфиксирующей активности — по редукции ацетилена, измеряемой на газовом хроматографе «Цвет-100». Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами [15].

Результаты и обсуждение. Большинство природных штаммов *R. meliloti* являются лизогенными [3, 4], поэтому одним из самых простых способов выявления влияния профага на симбиотические признаки бактерий может служить сравнение свойств специально полученного нелизогенного штамма с изолированными у него лизогенными вариантами. Ранее экспериментальным путем из штамма L5 клубеньковых бактерий люцерны был элиминирован профаг и получен его нелизогенный производный штамм — L5-30 [8]. Для лизогенизации мы выбрали три мутанта штамма L5-30, различающиеся по своим симбиотическим свойствам (табл. 1). Их лизогенизировали фагами *Rm1*, *Rm2* и *Rm3*. У каждого мутанта было получено 12 лизогенных штаммов. Лизогенные варианты сохранили морфологию колонии и маркеры исходных мутантов. Все лизогенные штаммы были иммунны к своему фагу и, в отличие от исходных культур, освобождали его как спонтанно, так и после УФ-индукции, причем в последнем случае титр фага, как пра-

вило, возрастал на 1—2 порядка (табл. 2). Освобожденные лизогенными штаммами бактериофаги сохраняли морфологию негативных колоний и свои трансдуцирующие свойства.

Ранее показано, что у клубеньковых бактерий сои штаммы, возникающие после обработки их бактериофагами, сохраняют устойчивость к лизогенизирующему фагу и освобождают его как спонтанно, так и

Таблица 2

Свойства лизогенных штаммов
Properties of R. meliloti lysogenic strains

Номера лизогенных вариантов	МЗ 1				М5				Д1			
	Лизогенизирующий фаг	Титр освобождаемого фага, б. о. е/мл		Лизогенизирующий фаг	Титр освобождаемого фага, б. о. е/мл		Лизогенизирующий фаг	Титр освобождаемого фага, б. о. е/мл				
		Спонтанно	После УФ-индукции		Спонтанно	После УФ-индукции		Спонтанно	После УФ-индукции			
1	Rm 1	4·10 ⁸	2·10 ⁹	Rm 1	3·10 ⁷	1·10 ⁹	Rm 1	1·10 ⁸	5·10 ⁸			
2	»	5·10 ⁸	1·10 ⁹	»	4·10 ⁷	7·10 ⁸	»	4·10 ⁷	8·10 ⁸			
3	»	3·10 ⁸	2·10 ⁹	»	6·10 ⁷	6·10 ⁸	»	1·10 ⁸	1·10 ⁹			
4	»	7·10 ⁷	8·10 ⁸	»	6·10 ⁷	2·10 ⁹	»	1·10 ⁸	1·10 ⁹			
5	Rm 2	5·10 ⁸	1·10 ⁹	Rm 2	1·10 ⁷	1·10 ⁸	»	2·10 ⁸	1·10 ⁹			
6	»	5·10 ⁸	1·10 ⁹	»	7·10 ⁶	1·10 ⁸	»	1·10 ⁸	1·10 ⁹			
7	»	3·10 ⁸	2·10 ⁹	»	6·10 ⁶	8·10 ⁷	Rm 3	1·10 ⁸	2·10 ⁹			
8	»	7·10 ⁷	8·10 ⁸	»	3·10 ⁶	2·10 ⁸	»	1·10 ⁶	1·10 ⁸			
9	Rm 3	1·10 ⁷	1·10 ⁸	Rm 3	5·10 ⁴	2·10 ⁶	»	5·10 ⁷	1·10 ⁹			
10	»	3·10 ⁷	3·10 ⁸	»	1·10 ⁵	3·10 ⁶	»	3·10 ⁷	6·10 ⁸			
11	»	1·10 ⁶	6·10 ⁷	»	3·10 ⁵	3·10 ⁷	»	1·10 ⁸	2·10 ⁹			
12	»	4·10 ⁵	2·10 ⁶	»	4·10 ⁵	2·10 ⁶	»	1·10 ⁶	1·10 ⁸			

после УФ-облучения. Однако титр фага после обработки его УФ-светом был не выше, а иногда даже ниже титра фага, выделяемого спонтанно [6]. Вероятно, у клубеньковых бактерий сои возникали не истинные лизогены, а варианты, у которых профаг поддерживался в клетке в виде автономной плазмиды и не включался в хромосому бактерии-хозяина. Аналогичное явление описано для фагов некоторых других видов бактерий [16].

Для того чтобы проследить за судьбой профага в ризобияльной клетке, мы проанализировали методом «щелочного лизиса» плазмидный состав у 17 изолированных лизогенных вариантов. Было установлено, что они не отличаются от исходных штаммов. Эти результаты свидетельствуют о том, что у изучаемых нами мутантов возникают истинные лизогенные штаммы, стабильно сохраняющие свое лизогенное состояние.

Для выявления влияния лизогенизации на симбиотические свойства бактерий мы изучили полученные лизогенные варианты в микровегетационных опытах. Следует отметить, что все три штамма, служившие исходным материалом для получения лизогенных клонов, различались по своим симбиотическим характеристикам — вирулентности, симбиотической эффективности и азотфиксирующей активности (табл. 1).

В условиях микровегетационного опыта все лизогенные клоны, полученные у штамма МЗ1, сохранили характер клубенькообразования, свойственный исходному родительскому штамму. Ни один из них не восстановил азотфиксирующую активность. Масса растений, инокулированных этими лизогенными штаммами, не отличалась достоверно от массы растений без инокуляции, т. е. по этому показателю они также были сходны с родительским штаммом МЗ1.

Анализ симбиотических свойств лизогенных вариантов, полученных у штаммов М5 и Д1 (табл. 3), свидетельствует о том, что среди них встречаются формы, обладающие достоверно сниженной азотфиксирующей активностью и эффективностью. Лизогенных вариантов, достоверно превышающих аналогичные показатели исходных штаммов,

мы не обнаружили. По данным Федорова и др. [17], среди 400 проанализированных клонов, возникших спонтанно у активного штамма *R. meliloti*, не выявлено ни одного, показавшего достоверное снижение или превышение симбиотических характеристик по сравнению с исходной культурой.

Таблица 3

Симбиотические свойства лизогенных штаммов, полученных у мутантов М5 и Д1
Symbiotic properties of lysogenic strains isolated from M5 and D1 mutants

Штаммы	М5		Д1	
	Масса растений, мг	Редукция C_2H_2 , мкМ на сосуд за 24 ч	Масса растений, мг	Редукция C_2H_2 , мкМ на сосуд за 24 ч
Исходные мутанты	12,63	1,17	17,53	2,58
Лизогенные варианты:				
1	9,92(—)	0,64(—)	16,40	2,22
2	11,60	1,10	17,28	2,36
3	11,17	0,80	12,38(—)	2,11
4	11,23	1,12	17,35	3,23
5	9,95(—)	1,11	17,75	2,08
6	11,58	1,08	17,00	2,78
7	10,00(—)	0,70	16,72	2,61
8	10,42(—)	0,70	17,10	2,02
9	11,45	0,91	17,82	2,94
10	10,23(—)	0,94	17,57	2,56
11	11,47	1,18	18,23	3,03
12	11,03	1,08	17,53	2,76
НСР _{0,05}	2,08	0,49	3,25	0,84

Примечание. Масса неинкулированных растений составляла 9,97 мг; знаком «—» отмечено статистически достоверное снижение показателей по сравнению с исходным штаммом.

Таблица 4

Влияние лизогенизации на симбиотические свойства клубеньковых бактерий люцерны
Effect of lysogenization on the *R. meliloti* symbiotic properties

Исходный штамм	Признак	Отклонение показателей симбиотических свойств лизогенных культур от исходного штамма				Количество лизогенных культур
		---	-	+	++	
М5	Азотфиксирующая активность	1	10	1	0	12
Д1		0	6	6	0	12
	Всего	1	16	7	0	24
М5	Симбиотическая эффективность	5	7	0	0	12
Д1		1	6	5	0	12
	Всего	6	13	5	0	24
	Общая сумма	7	29	12	0	48

Примечание. «—» — достоверное снижение показателей по сравнению с исходным штаммом; «-» и «+» — снижение или превышение показателей соответственно; «++» — статистически достоверное превышение показателей симбиотических свойств.

Суммарные результаты изучения симбиотических свойств лизогенных вариантов штаммов М5 и Д1 представлены в табл. 4. Среди лизогенных клонов имеются варианты со сниженной азотфиксирующей активностью и эффективностью. Так, из 24 проанализированных клонов 17 (71 %) обладали сниженной активностью азотфиксации. В одном случае это отличие было статистически достоверным. При анализе сим-

биотической эффективности этих же 24 лизогенных штаммов оказалось, что 19 из них (79 %) имели сниженную эффективность, причем у 6 отличия от исходного мутанта были достоверными. Коэффициент корреляции в данном случае составлял 0,41 и при 5 % вероятности имел статистически достоверный характер. Эти данные указывают на то, что уровень снижения симбиотической эффективности у лизогенных штаммов зависит от генотипа исходного мутанта. Сравнение частоты возникновения лизогенных штаммов с пониженной (6 из 24) и повышенной (0 из 24) симбиотической эффективностью подтверждает вывод о том, что лизогенизация нелизогенных штаммов действительно ведет к снижению их азотфиксирующей активности и (или) эффективности ($F_{ст 0,01} = 7,2$; $F_{экс} = 13,2$; $F_{экс} > F_{ст 0,01}$).

Ранее у штаммов М5 и М31 получены прототрофные трансдуктанты и изучены их симбиотические свойства [14]. Из семи исследованных трансдуктантов, полученных у штамма М5, два обладали повышенной азотфиксирующей активностью и превосходили по этому показателю эталонный штамм СХМ1. Из 27 трансдуктантов, возникших у штамма М31, шесть имели повышенную симбиотическую эффективность и (или) азотфиксирующую активность. Анализ симбиотических свойств полученных лизогенизированных штаммов свидетельствует о том, что фаговая конверсия сама по себе не является причиной возникновения штаммов с повышенной азотфиксирующей активностью и эффективностью. Появление таких штаммов, вероятно всего, обусловлено рекомбинационной перестройкой генома бактерии, происходящей при встраивании экзогенного фрагмента ДНК бактерии-донора в процессе осуществления трансдукции.

Известно, что при лизогенизации клетки помимо приобретения устойчивости к лизогенизирующему фагу могут менять и ряд других свойств [18]. Так, у клубеньковых бактерий клевера при лизогенизации происходит модификация соматического антигена, с которым ассоциирован рецепторный сайт лизогенизирующего фага [7]. Как было показано, изменения соматических антигенов *R. meliloti*, выявляемые с помощью моноклональных антител [19], могут приводить в ряде случаев к полной утрате симбиотической эффективности и вирулентности мутантных штаммов. Снижение показателей симбиотических характеристик у лизогенных культур по сравнению с исходными нелизогенными штаммами может быть одним из проявлений лизогенных конверсий у *Rhizobium*. Принимая во внимание тот факт, что большинство природных и производственных штаммов клубеньковых бактерий являются лизогенными, можно предположить, что путем «делизогенизации» лизогенных штаммов удастся повысить их азотфиксирующую активность и эффективность.

EFFECT OF LYSOGENIZATION ON THE SYMBIOTIC PROPERTIES OF NODULE BACTERIA OF LUCERNE

N. I. Novikova, B. V. Simarov

All-Union Research Institute of Agricultural Microbiology, Leningrad

Summary

Twelve lysogenic clones were isolated from each mutants (M5, M31 and D1) of nonlysogenic strain *Rhizobium meliloti* 1.5-30 while using three bacteriophages (Rm1, Rm2 and Rm3). These lysogenic strains were resistant to their own phages and released them spontaneously and after UV-induction which resulted in an increase of the phage titre by 1-2 order. Electrophoretic analysis did not reveal change in plasmid contents. It was shown that lysogenization of *R. meliloti* strains can decrease their nitrogen-fixing activity and efficiency as compared with initial nonlysogenic cultures.

1. Marshall K. C. A lysogenic strain of *Rhizobium trifolii* // Nature.—1956.—177, N 4498.—P. 92.
2. Schwinghamer E. A., Reinhardt D. J. Lysogeny in *Rhizobium leguminosarum* and *Rh. trifolii* // Austr. J. Biol. Sci.—1963.—16, N 3.—P. 597—605.
3. Szende K., Ördögh F. Die Lysogenie von *Rhizobium meliloti* // Naturwissenschaften.—1960.—47, N 17.—S. 404—405.
4. Маранц Л. А., Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И. Лизогения клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) // Изв. АН СССР.—Сер. биол.—1973.—Вып. 5.—С. 720—728.
5. Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И. Лизогения клубеньковых бактерий фасоли (*Rhizobium phaseoli*) // Микробиология.—1969.—38, № 2.—С. 340—345.
6. Андреева И. Н., Москаленко Л. Н. О некоторых особенностях экспериментально полученных лизогенных культур *Rhizobium japonicum* // Там же.—1982.—51, № 5.—С. 832—837.
7. Barnett Y. M., Vincent J. M. Lysogenic conversion of *Rhizobium trifolii* // J. Gen. Microbiol.—1970.—61, pt 3.—P. 319—325.
8. Kowalski M. Prophage substitution in *Rhizobium meliloti* strains // Microbiol. Genet. Bull.—1965.—22.—P. 19.
9. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Трансдукция у *Rhizobium meliloti* // Генетика.—1984.—20, № 4.—С. 542—548.
10. Федоров С. Н., Зарецкая А. Н. Индуцирование этилметансульфонатом ауксотрофных мутантов *Rhizobium meliloti* и их характеристика // Микробиология.—1978.—47, № 4.—С. 728—732.
11. Федоров С. Н., Бутвина О. Ю., Симаров Б. В. Мутагенное действие УФ-излучения на клубеньковые бактерии люцерны и анализ симбиотических свойств полученных ауксотрофных мутантов // Генетика.—1983.—19, № 5.—С. 727—736.
12. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Выделение трансдуцирующих фагов *Rhizobium meliloti* // Там же.—№ 2.—С. 331—332.
13. Исследование молекулярно-генетических механизмов вирулентности клубеньковых бактерий. Сообщение II. Биохимическая характеристика и стабильность эксконъюгантов *Rhizobium meliloti* / А. А. Аронштам, Т. А. Чернова, М. Л. Румянцева, Б. В. Симаров // Там же.—№ 4.—С. 565—570.
14. Новикова Н. И., Симаров Б. В. Симбиотические свойства прототрофных трансдуктантов клубеньковых бактерий люцерны // Там же.—1984.—20, № 9.—С. 1450—1456.
15. Доспехов Б. А. Планирование полевого опыта и статистическая обработка его данных.—М.: Колос, 1972.—128 с.
16. Hemphill H. E., Whiteley H. R. Bacteriophages of *Bacillus subtilis* // Bacteriol. Rev.—1975.—39, N 3.—P. 257—315.
17. Получение мутантов *Rhizobium meliloti* с измененными симбиотическими свойствами / С. Н. Федоров, И. Г. Фокина, Н. Н. Мультиатули и др. // Биол. фиксация молекуляр. азота: Тез. докл. IV Всесоюз. Баховского коллоквиума.—Киев, 1983.—С. 127—129.
18. Barksdale L., Arden S. B. Persisting bacteriophage infection, lysogeny and phage conversions // Anp. Rev. Microbiol.—1974.—28.—P. 265—299.
19. Monoclonal antibodies to *Rhizobium meliloti* and surface mutants insensitive to them / E. Johansen, T. M. Finan, M. L. Geffer, E. R. Signer // J. Bacteriol.—1984.—160, N 1.—P. 454—457.

ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград

Получено 5.02.86

Окончание. Начало см. на с. 83—87.

- A. I. Gottlieb, M. H. Heggeness, J. E. Ash, S. J. Singer // J. Cell. Physiol.—1979.—100, N 3.—P. 563—578.
7. Kupfer A., Loward D., Singer S. J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1982.—79, N 6.—P. 2603—2607.
8. Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Центриоли в клеточном цикле. II. Интерфаза и первая половина митоза // Биол. науки.—1978.—№ 11.—С. 54—64.
9. Гудима Г. О., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Поведение клеточного центра при распластывании эпителиальных клеток // Цитология.—1986.—28, № 6.—С. 576—581.
10. Tucker R. W. Role of microtubules and centrioles in growth regulation of mammalian cells // Cell and Muscle Motility.—1983.—3, N 3.—P. 259—295.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 8.05.86