

**Молекулярная
генетика
взаимодействия
бактерий
с растениями**



**Molecular
Genetics of the
Bacteria -
Plant
Interaction**

**Молекулярная
генетика
взаимодействия
бактерий
с растениями**

**Molecular
Genetics of the
Bacteria - Plant
Interaction**

Molecular Genetics of the Bacteria - Plant Interaction

Edited by A. Pühler



Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York Tokyo 1983

Молекулярная генетика взаимодействия бактерий с растениями

Перевод с английского А. В. Русинова

Под редакцией доктора биологических наук
В. Г. Никифорова

С предисловием доктора биологических наук
Э. С. Пирузян



Москва ВО «Агропромиздат» 1988

УДК 579.25 : 581.557

Молекулярная генетика взаимодействия бактерий с растениями/Пер. с англ. А. В. Русинова; Под ред. В. Г. Никифорова; С предисл. Э. С. Пирузян. — М.: «Агропромиздат», 1988.—416 с.— ISBN 5—10—001579—9.

В книге представлены новейшие достижения в исследованиях по биологической фиксации атмосферного азота клубеньковыми бактериями ризобиями в симбиозе с бобовыми растениями — построение кольцевых генетических карт, локализация генов, управляющих формированием клубеньков и азотфиксацией, выяснение взаимодействия генов растений-хозяев с бактериальными в этих процессах. Рассмотрены также механизм образования опухолей у растений в результате трансформации растительных клеток ДНК агробактерий и генетика фитопатогенных бактерий, в частности видов псевдомонад.

Иллюстраций 156, таблиц 37, список литературы 921 название.

Рекомендовано к изданию Институтом химической физики АН СССР

М $\frac{3803010300-494}{035(01)-88}$ 213-87

ISBN 3—540—12798—4

ISBN 0—387—12798—4

ISBN 5—10—001579—9

© by Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1983

© Перевод на русский язык и предисловие
ВО «Агропромиздат», 1988

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Повышенный интерес к проблеме взаимодействия бактерий с растениями, наблюдаемый в настоящее время, обусловлен прежде всего тем, что в центре внимания оказались бактерии двух родов (*Agrobacterium* и *Rhizobium* семейства Rhizobiaceae), являющиеся причинными агентами важнейших с агрономической точки зрения процессов — опухолообразования у двудольных и формирования азотфиксирующих клубеньков у бобовых.

В предлагаемой вниманию читателей книге рассматриваются различные аспекты процесса взаимодействия *Agrobacterium*, *Rhizobium* и некоторых фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas*, *Erwinia*) с растениями. В определенных пределах высшее растение можно рассматривать как сообщество множества клеток. Представители различных классов организмов, включая насекомых, клещи, нематоды, грибы, а также бактерии и вирусы, влияют на это сообщество многообразными способами, нарушая или изменяя развитие клеток, тканей и органов растения. Исход взаимодействия между растениями и патогенными микроорганизмами в норме детерминирована способностью последних к узнаванию растения-хозяина. Уже в самых ранних экспериментах по индукции опухолей типа корончатых галлов было показано, что раневое повреждение потенциального хозяина существенно для процесса трансформации. Все предпринятые до сих пор попытки индуцировать первичные опухоли путем нанесения вирулентных агробактерий на неповрежденный эпидермис оказались безуспешными. Таким образом, раневое повреждение растений-хозяина — необходимая предпосылка общего процесса образования корончатых галлов у растений в результате заражения *A. tumefaciens*.

Родственность *Agrobacterium* и *Rhizobium* заключается в том, что они способны взаимодействовать с высшими растениями и инициировать развитие локализованной клеточной пролиферации: после раневой инфекции растений вирулентными штаммами *Agrobacterium* образуются опухоли, а являющиеся симбионтами штаммы *Rhizobium* вызывают у бобовых образование корневых клубеньков, способных осуществлять фиксацию молекулярного азота атмосферы. Процессы галлообразования и нодуляции (образования клубеньков) характеризуются многими общими чертами. Однако, хотя как в том, так и в другом случае причина клеточной пролиферации, вероятно, заключается в изменении фитогормонального баланса, механизм ее индукции и развития в обоих случаях совершенно различен.

В процессе изучения взаимодействия *A. tumefaciens* с растением выявился изящный и необычный механизм опухолообразования, суть которого заключается в том, что фрагмент опухолеродной

Ti-плазмиды (от «tumor inducing»), так называемая T-ДНК (от «transfer»), переносится в растительную клетку, стабильно интегрируется и становится частью ядерной ДНК трансформированной растительной клетки. Аналогичный механизм действует в случае синдрома «бородатый корень», индуцируемого другим представителем рода *Agrobacterium* — *A. rhizogenes*, в клетках которого содержится Ri-плазида (от «root inducing»). Интеграция чужеродного фрагмента ДНК бактериального происхождения в хромосому растительной клетки приводит в результате экспрессии этой ДНК (Т-ДНК) к трем основным фенотипическим проявлениям. Первое из них заключается в том, что растительная клетка перерождается в опухолевую (трансформируется), начинается ее безудержное, неконтролируемое деление, и в результате дедифференцированного роста пролиферирующие ткани растения образуют опухоль — корончатый галл. Второе фенотипическое изменение, происходящее в трансформированных клетках растений, в отличие от здоровых состоит в том, что их рост становится гормон-независимым в результате синтеза эндогенных фитогормонов определенными генами Т-ДНК. Наконец, третьим новым фенотипическим признаком трансформированных в результате заражения *Agrobacterium* клеток является синтез специфических, характерных только для них соединений — опинов. Благодаря синтезу опинов в опухолевых тканях онкогенные агробактерии занимают определенную экологическую нишу, предпочтительную для патогена. Несколько групп почвенных бактерий, обитающих в ризосфере растений или рядом с ней, способны утилизировать выделяемые растениями органические соединения. Способность микроорганизмов захватывать определенную экологическую нишу часто зависит от активности очень небольшого числа генов, которые отсутствуют у конкурирующих видов. Своеобразие вирулентных агробактерий заключается в том, что они обеспечивают синтез опинов путем встраивания фрагмента своей ДНК в геном растения, направляя таким образом метаболизм растительной клетки в русло, выгодное самому патогену. Однако значение опинов не ограничивается питательными потребностями агробактерий: опины способствуют конъюгативному переносу опухолеродных плазмид из клеток в клетки, что ведет к распространению возбудителя болезни и увеличению масштабов заражения. Таким образом, в данном случае мы имеем пример особого, совершенно неожиданного рода паразитизма, который обозначается своеобразным термином «генетическая колонизация». Все три новых признака растительных клеток, трансформированных вследствие инфекции патогенными бактериями рода *Agrobacterium*, являются результатом экспрессии генов Т-ДНК, транспозлируемых в геном высшего растения.

Необычный, и в то же время довольно широко распространенный процесс образования корончатых галлов у растений представляет собой уникальный пример миграции ДНК бактерий в наследственный материал эукариотической клетки, когда преодолеваются установленные самой природой барьеры между про- и эукарио-

тами, предназначенные для того, чтобы предотвратить обмен генами между ними. В этом смысле исследования, проведенные с Ti-плазмидами, значительно расширили наши представления о способах взаимодействия микроорганизмов с высшими организмами, и вполне возможно, что это лишь первый пример многообразия форм взаимодействия бактерий с эукариотическими организмами и что в природе существует еще ряд нераскрытых механизмов взаимодействия организмов.

Открытие в 1977 г. уникального процесса транспозиции (переноса и стабильной интеграции) фрагмента бактериальной ДНК в геном высших растений привлекло внимание широкого круга исследователей в связи с возможностью применения этого природного пути в целях экспериментального манипулирования с геномом растения. Биологический смысл этого интересного явления заключается в том, что Ti-плазида действует как природный инструмент для переноса новых генов в растения и, следовательно, может служить экспериментальным вектором для введения чужеродных генов практически любого происхождения в геном высших растений. В нескольких лабораториях различных стран, в том числе и в нашей стране, эти теоретические предпосылки получили развитие в экспериментальных работах по переносу генов различного происхождения в растения и получению «химерных» трансгенных растений.

Вызванная бактериями рода *Rhizobium* индукция органогенеза клубеньков на корнях бобовых растений (нодуляция) — сложный процесс, включающий цепь специфических взаимодействий между растением-хозяином и инфицирующими бактериями. Наиболее важный вопрос в процессе азотфиксации корневыми клубеньками, с точки зрения аналогии с процессом галлообразования родственными агробактериями, касается самого механизма нодуляции у бобовых. Последовательность событий, приводящих к эффективному образованию клубеньков, включает специфическую экспрессию генов хозяина и *Rhizobium* на многих различных уровнях. Молекулярно-генетическое изучение этого сложного процесса, в частности выделение плазмид у различных штаммов *Rhizobium*, картирование плазмидных генов, детерминирующих процесс симбиотической азотфиксации, а также идентификация генов растения-хозяина, кодирующих функции самого растения, участвующие в этом процессе, значительно продвинули изучение процесса фиксации атмосферного азота бобовыми растениями как одного из важнейших с агрономической точки зрения.

Рассмотренные в книге «Молекулярная генетика взаимодействия бактерий с растениями» различные аспекты галлообразования, нодуляции и взаимодействия патогенных бактерий с высшими растениями представляют большой интерес для широкого круга специалистов в области молекулярной генетики и биологии, физиологии растений и фитопатологии.

Доктор биологических наук,
профессор Э. С. Пирузян

ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Результаты проведенных за прошедшее десятилетие исследований свидетельствуют о том, что изучение взаимодействия бактерий с растениями имеет важное значение для развития сельскохозяйственной науки. Особенно широко изучались фитопатогенные бактерии, симбиотическое связывание азота и опухолеобразование у растений. В связи с этим некоторые из моих коллег выражали пожелание организовать специальный симпозиум на тему «Молекулярная генетика взаимодействия бактерий с растениями», и такой симпозиум состоялся в университете города Билефельда (ФРГ) осенью 1982 г. Консультативный комитет Международной программы совместно с Национальным организационным комитетом первоначально решили сконцентрировать внимание на следующих трех проблемах:

1. Взаимоотношения *Rhizobium* с растениями.
2. Взаимоотношения *Agrobacterium* с растениями.
3. Фитопатогенные бактерии.

Ретроспективно можно сказать, что эти проблемы действительно пользуются наибольшей популярностью: почти все известные в научном мире группы исследователей, работающие в данной области, приняли участие в билефельдском симпозиуме. Представленные доклады опубликованы в данном сборнике как Труды симпозиума. Как видно из содержания, сборник представляет собой наиболее полное собрание работ по молекулярной генетике взаимодействия бактерий с растениями. Книга будет полезна научным работникам и студентам для ознакомления с основополагающими принципами и идеями, разрабатываемыми в последние годы в этой быстро развивающейся области знания.

Симпозиум финансировался Федеральным министерством по науке и технике, поэтому от имени Организационного комитета я выражаю ему искреннюю признательность за содействие, без которого проведение симпозиума не представлялось возможным. Кроме того, я хотел бы поблагодарить некоторые промышленные компании за оказанную нам помощь.

Наконец, я считаю необходимым выразить глубокую признательность студентам и сотрудникам нашего факультета, посвятившим много времени организации симпозиума, а также его секретарям Аннелизе Хофман и Сусанне Мальмиваара за их помощь в координации работы симпозиума.



Общее введение

1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИИ С РАСТЕНИЯМИ

У. ХОЙМАН*

В качестве введения к данной книге я хотел бы сделать несколько замечаний исторического характера о развитии взглядов на взаимоотношения партнеров в системе бактерии — растение. Одна из бед нашего времени состоит в утере интереса к истории, в то время как история науки — это не столько перечисление фактов, сколько захватывающая драма развития научных идей.

Около 150 лет назад химики и физики задались вопросом, что является источником азота, доступного зеленым растениям. Эта проблема занимала великие умы: если Пристли и Инген-Гаус полагали, что все растения поглощают свободный азот из воздуха, то Соссюр и Либих оспаривали это. Буссенго первым показал в 1838 г., что горох и клевер могут усваивать азот атмосферы, в то время как пшеница не обладает такой способностью. Проблема азотного питания растений стала одной из основных научных тем

многих сельскохозяйственных опытных станций, крупных частных ферм, а также университетов. Давно было известно, что бобовые занимают в этом отношении особое положение, но было не ясно почему. Во второй половине XIX века появилось немало публикаций, в которых высказывалось предположение о том, что в ассимиляции свободного азота воздуха участвуют бактерии или грибы и что формирование корневых клубеньков у бобовых растений индуцировано этими микроор-



Рис. 1.1. Растение *Faba* с корневыми клубеньками, изображенное в травнике Фукса (издание 1542 г.) (По Fred, Baldwin, McCoy: Root nodule bacteria and leguminous plant, Madison, 1932).

* W. Heumann, Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Erlangen-Nürnberg, 8520 Erlangen, BRD.

ганизмами (рис. 1.1). Таково было положение вещей, когда 20 сентября 1886 г. Г. Гельригель сообщил о своем открытии. Это произошло на заседании 29-й секции (Исследования в области сельского хозяйства) 59-й сессии Общества немецких естествоиспытателей и врачей в Берлине. Доклад Гельригеля был озаглавлен: «В какой форме азот доступен для растений?». В нем сравнивались источники азота для злаковых и бобовых культур: «Злаки целиком зависят от нитратов почвы, в то время как бобовые, помимо азота почвы, располагают еще одним источником этого элемента. Это свободный элементарный азот воздуха. Так называемые корневые клубеньки бобовых растений непосредственно связаны с ассимиляцией свободного азота. Их появление на кор-



Герман Гельригель (1831—1895).
(По Fred, Balduin McCoy: Root nodule bacteria and leguminous plant, Madison, 1932).

нях может быть индуцировано небольшим количеством пахотной почвы или предотвращено исключением из почвы микроорганизмов». Это было достаточно четкое объяснение. Гельригель опубликовал свои результаты в обширной статье, написанной совместно с Х. Вильфартом, химиком из Бернбурга (Тюрингия) [10]. На сессии в Берлине председательствовал Дж. Гильберт, представитель Ротамстедской опытной станции (Англия). Он подтвердил справедливость результатов Гельригеля в своих опытах, проведенных в Англии совместно с Дж. Лоузом [14]; У. Атуотер и К. Вудс сделали то же самое в США [2]; Т. Шлезинг и Э. Лоран — во Франции [20] и В. Альпе и А. Менюцци — в Италии [1]. В течение шести лет результаты Гельригеля получили признание и были подтверждены во всех странах Европы и в США.

Потребовалось не более десяти лет, чтобы на основе открытия Гельригеля решить все важные вопросы для дальнейшего понимания симбиоза *Rhizobium* с бобовыми растениями. Перечислим несколько работ. В 1888 г. знаменитый голландский бактериолог М. Бейеринк выделил из клубеньков бактерии, вырастил их в чистой культуре и назвал *Bacillus radicolica* (рис. 1.2) [3]. Позднее, по предложению Б. Франка, это название было изменено на *Rhizobium* [9]. А. Празмовский впервые показал, что *Rhizobium* удовлетворяют постулатам Роберта Коха о паразитических бактериях [19]: он индуцировал образование клубеньков на растениях гороха при помощи чистой культуры *Rhizobium leguminosarum* и повторно выделил микросимбионт из этих клубеньков. Все попытки

обнаружить фиксацию азота свободноживущими *Rhizobia* оказались безуспешными или дали неопределенные результаты. С другой стороны, был твердо установлен факт связывания азота воздуха в клубеньках. Пролить свет на эту проблему удалось Ф. Ноббе и Л. Хильтнеру, специалистам по *Rhizobium*, сотрудникам Королевской саксонской опытной станции по физиологии растений в Таранде, близ Дрездена. Они пришли к выводу, что дифференциация палочковидных бактерий в бактероиды внутри клубеньков может быть необходимым условием связывания азота [17]. Кроме того, Ноббе и Хильтнер первыми оценили биотехнологические возможности *Rhizobium*. Они заключили контракт с фирмой «Фарверке Хоэст» о производстве нитрагина — культур *Rhizobium* — для продажи фермерам с целью инокуляции им пахотной почвы [18]. Однако фирма столкнулась с рядом трудностей, и три года спустя производство нитрагина было прекращено. Это объясняется тем, что в конце прошлого века еще не были решены проблемы специфичности растения-хозяина и субстрата для инокуляции. Позднее работа была продолжена, в частности в США, в результате чего были усовершенствованы условия инокуляции почвы бактериями *Rhizobium*, так что даже в наши дни можно заметно повысить урожайность сельскохозяйственных культур путем соответствующим образом проведенной инокуляции почвы.

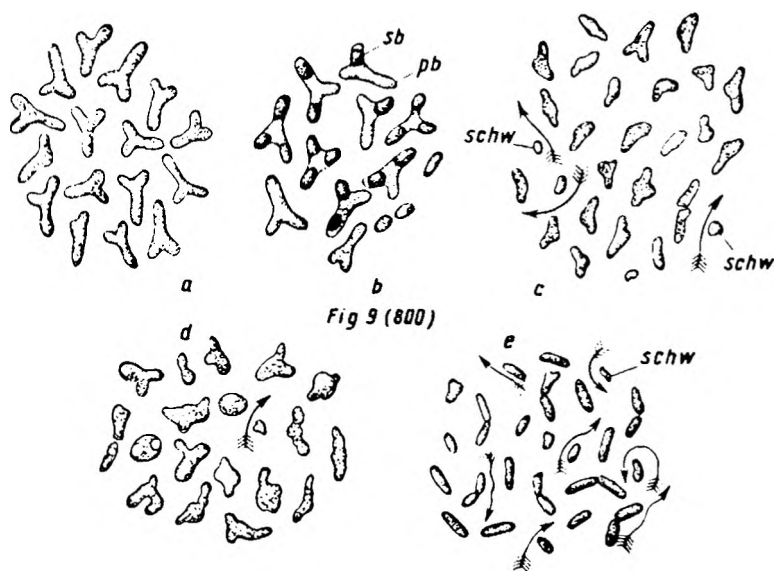


Рис. 1.2. Оригинальный рисунок бактероидов, выполненный Бейеринком в 1888 г. «Рис. 9. *Bacillus radicola* var. *fabae*»

schw — зооспоры; *a* — нормальные бактероиды; *b* — бактероиды с жировыми каплями; *pb* — первичные «воздутия»; *sb* — вторичные «воздутия»; *c* — бактерии из небольшой колонии на студенистом налете, образовавшемся на стебле конских бобов; *d* — бактероиды из небольшой колонии на студенистом налете, образовавшемся на стебле конских бобов; *e* — бактерии в питательном отваре из стеблей конских бобов». (По Bot. Z. 188, vol. 46, plate XI).

К концу XIX века были выяснены почти все фундаментальные вопросы симбиоза *Rhizobium* с бобовыми и постоянно продолжали появляться статьи, трактующие эти проблемы, однако не было новых идей. Единственное, действительно важное открытие было сделано в 1939 г. Хидео Кубо, который установил, что красный пигмент клубеньков представляет собой гемоглобин, служащий для переноса кислорода — источника энергии для процесса фиксации азота [13].

Теперь подытожим данные о взаимодействиях в другой важной системе бактерии — растение, в которой также участвуют *Rhizobiaceae*, речь идет об образовании опухолей у растений под влиянием *Agrobacterium tumefaciens*. Исследование опухолеобразования у растений началось совершенно независимо от изучения проблемы симбиотического образования клубеньков у бобовых. Установление тесных таксономических связей между *Agrobacterium* и *Rhizobium* и, как следствие, очевидная идея сравнения механизмов образования опухолей и клубеньков — это достижение наших дней. Пионерами в области изучения корончатых галлов были американский фитопатолог Э. Смит и датский ветеринар К. Енсен, которые заинтересовались этой проблемой примерно через 20 лет после публикации результатов работы Гельригеля с *Rhizobium*. Совместно со своим сотрудником Таунсендом Смит опубликовал в двух статьях результаты по индукции опухолеобразования у парижской хризантемы (*Chrysanthemum frutescens*) чистой культурой бактерий *A. tumefaciens*. Независимо в Европе Енсен изучал опухолеобразование у растений как модель аналогичного процесса у животных. Исследуя опухолеобразование у свеклы, он показал, что агентом, индуцирующим этот процесс, является *A. tumefaciens*. Самым крупным специалистом по корончатым галлам, который продолжил работы Смита и Енсена, был и остается А. Браун. Он детально исследовал механизм трансформации растительной клетки бактериями и показал, что происходящие в ней изменения долговременны и стабильны. После трансформации можно вызвать гибель индуцирующих ее бактерий путем теплового воздействия на опухоль при 46—47 °С, что не влияет на автономный рост трансформированных растительных клеток [4, 5]. В последующие годы было обнаружено, что трансформированные клетки растений автотрофны по таким фитогормонам, как ауксины и цитокинины. Дальнейшие исследования были направлены главным образом на установление различий в регуляции роста между трансформированными и дифференцированными растительными клетками и на идентификацию бактериального начала, индуцирующего опухоли.

При ретроспективном анализе исследований с *Agrobacterium* и *Rhizobium*, начиная примерно с 1945 г. и по настоящее время, поражает тот факт, что ученые, работающие в этой области, почти полностью игнорировали достижения эры классической генетики бактерий (1945—1960 гг.), которые оказали революционизирующее влияние на биологию в целом. Думаю, я был единственным,

кто начал конъюгационные эксперименты с *Rhizobium* в 50-е годы [11]. Однако в последние годы ситуация с Rhizobiaceae резко изменилась благодаря трем важным открытиям.

1. Установлению того факта, что нитрогеназа эффективно восстанавливает ацетилен до этилена [7, 21].

2. Переносу генов *nif* из *Klebsiella* в *E. coli* посредством конъюгации [8].

3. Описанию Ti-плазмиды *A. tumefaciens* на молекулярном уровне и демонстрации переноса и стабильной интеграции T-ДНК в ДНК растения — недавним достижением в области исследований Rhizobiaceae, являющимся заслугой трех разных групп, которые осуществили это почти одновременно: Нестера и Чилтона (1977) в Снэтле, США; Ван Монтегю и Шелла (1979) в Генте, Бельгия; Схильперорта и Ледебура (1978) в Лейдене, Голландия.

Эти открытия ознаменовали начало новой эры в прикладной и фундаментальной генетике. Эта эра, какой бы короткой она еще ни была, принесла уже так много впечатляющих результатов, что представляется оправданным форум всех специалистов, цель которого — определить состояние исследований и наметить пути их дальнейшего развития.

Развитие исследований Rhizobiaceae за прошедшие 100 лет кажется сравнительно медленным. К счастью, в настоящее время молекулярная биология и генная технология вооружены достаточно мощными средствами и методами, позволяющими уверенно вступить в следующее столетие исследований взаимодействия бактерий с растениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alpe V, Menozzi A (1892) Studi e ricerche sulla questione dell' assimilazione dell' azoto per parte delle piante. Bol Nat Agrar (Roma) 14 (1):747—779
2. Atwater WO, Woods CD (1892) The fixation of free nitrogen by plants. Conn Agric Exp Stn Annu Rep (Storrs) 5:17—22.
3. Beyerinck MW (1888) Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen. Bot Z 46:725—735, 741—750, 757—771, 781—790, 797—804
4. Braun AC (1943) Studies on tumor inception in the crown-gall disease. Am J Bot 30:674—677
5. Braun AC (1947) Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. Am J Bot 34:234—240
6. Chilton MD, Drummond HJ, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown-gall tumor-genesis. Cell 11:263—271
7. Dilworth MT (1966) Acetylen reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochim Biophys Acta 127:285—294
8. Dixon RA, Postgate JR (1972) Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. Nature 237:102—104
9. Frank B (1889) Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber Dtsch Bot Ges 7:332—346
10. Hellriegel H, Wilfarth H (1888) Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilagen Z Ver Rübenzucker Ind Dtsch Reiches, 234 pp
11. Heumann W (1962) Genetische Untersuchung sternbildender Bakterien. Z Vererbungsl 93:441—452

12. Jensen CO (1910) Von echten Geschwülsten bei Pflanzen. Rapp Conf Int Etude Cancer 2:243—254
13. Kubo H (1939) Über Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen. Acta Phytochim (Jpn) 11:195—200
14. Lawes JB, Gilbert JH (1891) The sources of the nitrogen of our leguminous crops. J R Agric Soc Engl 2, Ser 3:657—702
15. Ledebøer AM (1978) Large plasmids in *Rhizobiaceae*. I. Studies on the transcription of the tumor inducing plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in sterile crown gall tumor cells. II. Studies on large plasmids in different *Phizobium species*. Thesis Univ Leiden, The Netherlands
16. Montagu M Van, Schell J (1979) The plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Timmis KN, Pühler A (eds) Plasmids of medical environmental and commercial importance. Developments in genetics, vol. 1. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, p 494
17. Nobbe F, Hiltner L (1893) Wodurch werden die knöllchenbesitzenden Leguminosen befähigt, den freien atmosphärischen Stickstoff für sich zu verwerten? Landwirtsch Vers Stn 42:459—478
18. Nobbe F, Hiltner L (1897) Die Boden-Impfung für Leguminosen mit reinkultivierten Bakterien. Farbwerke vorm. Meister Lucius u. Brüning, Hoechst a. Main, p 32
19. Prazmowski A (1890) Die Wurzelknöllchen der Erbse. Landwirtsch Vers Stn 37:161—238
20. Schloesing T Jr, Laurent E (1890) Sur la fixation de l'azote gazeuse par les Léguminenses. CR Acad Sci (Paris) III:750—753
21. Schollhorn R, Burris RH (1967) Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. Proc Natl Acad Sci USA 58:213—216
22. Smith EF, Townsend CO (1907a) A plant-tumor of bacterial origin. Science 25:671—673
23. Smith EF, Townsend CO (1970b) Ein Pflanzentumor bakteriellen Ursprungs. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Abt 2, 20:89—91

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ RHIZOBIUM С РАСТЕНИЯМИ

ДЖ. БЕРИНДЖЕР*

ВВЕДЕНИЕ

За последние 10 лет наши знания в области генетики *Rhizobium* значительно расширились. Уже построены кольцевые карты сцепления хромосом четырех видов быстрорастущих ризобий [3] и установлено местоположение ряда генов, управляющих образованием клубеньков и азотфиксацией. Здесь обсуждены некоторые аспекты взаимодействия *Rhizobium* с растениями, которые требуют дальнейшего изучения, чтобы иметь возможность полностью использовать наши знания по генетике для создания улучшенных штаммов *Rhizobium* с целью инокуляции ими пахотной почвы.

СОБЫТИЯ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ

Ризобии представляют собой группу грамотрицательных почвенных бактерий, способных в течение длительного времени обитать в почве в отсутствие растений-хозяев. Неясно, в какой мере ризобии приспособлены к жизни в почве, хотя это и важно знать для понимания причин индукции ризобиями образования клубеньков у бобовых растений и выяснения вопроса о продолжительности выживания используемых для инокуляции штаммов ризобий в почве. К сожалению, невозможно определить численность популяции ризобий в той или иной почве. Однако можно подсчитать число ризобий, способных вызвать образование клубеньков у испытываемых растений. Однако подсчеты, основанные на определении самого низкого разбавления образцов почвы, при котором еще возможно образование клубеньков у определенного хозяина, не дают представления о числе ризобий, способных вызвать этот процесс у других хозяев или утративших гены, ответственные за образование клубеньков. Ограничения в осуществлении точного учета ризобияльных клеток обусловлены в основном двумя причинами. Первая заключается в том, что ризобии конкурируют между собой при взаимодействии с корнями. Так, штамм, используемый для инокуляции, индуцирует образование клубеньков только в том случае, если он обладает высокой конкурентоспособностью или если его взаимодействию с растением-хозяином препятствует лишь небольшое число ризобий других штаммов. Обычно природные штаммы ризобии весьма конкурентоспособны, и их наличие в зна-

* J. E. Beringer, Soil Microbiology Department, Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK.

чительной степени усложняет использование улучшенных штаммов *Rhizobium* для инокуляции почвы [5, 6].

Вторая причина, по которой почвенные популяции имеют существенное значение, состоит в том, что они представляют собой источник ДНК, обменивающейся с ДНК вводимых в почву инокулянтов. В других разделах данной книги речь пойдет о плазмиде *Rhizobium* и *Agrobacterium* и обмене этими плазмидами между представителями рода *Rhizobiaceae*. Одно растение бобовых, по видимому, содержит около 10^8 ризобий, ассоциированных с его корневой системой. Поэтому если суточная частота переноса плазмид составляет всего лишь 10^{-6} , то на одно растение в день образуется не менее 100 новых генотипов ризобий. Большая часть «новых» штаммов теряется, однако те из них, которые имеют селективное преимущество, будут отбираться и могут стать преобладающими. Пока нет данных о том, что происходит с внесенными в почву ризобияльными штаммами в отношении сохранения плазмид или новых генов, введенных в эти штаммы, хотя есть сообщения о снижении числа серологически идентифицируемых или устойчивых к антибиотикам ризобий, внесенных в почву [8].

Исчезновение подобных идентифицируемых ризобий после инокуляции ими почвы не обязательно связано с генетическим обменом. Например, почвы с очень низкими значениями pH редко содержат ризобии, и при инокуляции таких почв численность ризобий в них быстро сокращается [14]. Это, возможно, обусловлено тем, что ризобии не обладают способностью выживать при низком pH, хотя утрата генов, ответственных за образование клубеньков, в условиях низкого pH приведет к аналогичному сокращению числа бактерий, индуцирующих этот процесс у индикаторных растений. Еще предстоит выяснить, насколько важны такие физические факторы, как pH, температура и влажность, для сохранения генов, ответственных за симбиоз. Некоторые штаммы *Rhizobium* и *Agrobacterium* могут быть излечены от некоторых своих плазмид путем выращивания *in vitro* при повышенной температуре.

ИНФЕКЦИЯ

Формирование клубеньков на растении под влиянием *Rhizobium* связано с выполнением ряда условий. Первое из них состоит в том, что бактерии должны попасть в те участки растений, которые восприимчивы к инфекции. Для большинства растений, которые инфицируются через корни, это не является проблемой, если в почве содержится достаточное количество бактерий. Однако у таких растений, как *Sesbania* и *Aeschynomene*, формирующих клубеньки и на стеблях, доступ к пригодным участкам может ограничивать число образовавшихся клубеньков. Остается открытым вопрос о том, играет ли хемотаксис бактерий на экссудаты корней какую-либо роль в образовании клубеньков. Так, было показано, что ризобии обладают хемотактическими свойствами [7, 9, 11], однако, с другой стороны, неподвижные мутанты также способны к формированию клубеньков [11]. Тем не менее все еще не ясно, играет

ли хемотаксис какую-либо роль в повышении конкурентоспособности штаммов, которые особенно хорошо адаптировались к определенным растениям-хозяевам. Подвижные штаммы, по-видимому, обладают более высокой конкурентоспособностью, чем неподвижные [1].

Наиболее важным аспектом инфекции является способность к узнаванию у растения-хозяина и штамма ризобий. О ней судят в основном по способности данной комбинации штамма ризобий и растения к симбиотической ассоциации, обеспечивающей связывание азота. Подобные наблюдения привели к выделению хорошо известных групп и видов *Rhizobium*, способных к перекрестной инокуляции. Ясно, однако, что узнавание может осуществляться на многих этапах развития клубеньков. Одна из экстремальных ситуаций — отсутствие инфекции. В противоположном случае клубеньки развиваются до этапа образования бактероидов, однако при этом не синтезируется гемоглобин или не происходит связывание азота. Между этими крайними случаями существует множество промежуточных этапов, на которых развитие инфекции может прерываться. Есть надежда, что анализ формирования дефектных клубеньков с использованием мутантов и штаммов дикого типа позволит идентифицировать соответствующие этапы. Трудности, возникающие при изучении природы узнавания, обусловлены тем, что процессы инфекции, образования клубеньков и фиксации азота в значительной степени зависят от условий окружающей среды и генотипов хозяина и *Rhizobium*. Например, *R. leguminosarum* эффективно индуцирует образование клубеньков у *Phaseolus vulgaris* in vitro, но фиксации азота при этом не происходит [4]. Однако при посеве *P. vulgaris* в полевых условиях в почву, не содержащую *R. phaseoli*, клубеньки не формируются, даже в том случае, если в ней много *R. leguminosarum*, которые способны эффективно индуцировать образование клубеньков у гороха (*Pisum sativum*) и *Vicia faba*.

Следует еще раз подчеркнуть значение условий окружающей среды и взаимодействий генотип \times генотип, поскольку эти факторы, возможно, определяют все стороны взаимоотношений между ризобиями и растениями. Например, Натман идентифицировал у клевера (*Trifolium pratense*) пять генов, участвующих в формировании клубеньков, и показал, что симбиотическое проявление четырех из них зависит от штамма ризобии [12]. Аналогичная зависимость от генотипа ризобий была обнаружена и у других бобовых растений [2, 12]. Пэнкхерст и др. [13] показали, что мутант *R. trifolii*, характеризующийся потребностью в рибофлавине, индуцировал у некоторых разновидностей клевера дефектные (Fix⁻) клубеньки, в то время как у других разновидностей клубеньки были Fix⁺. Оказалось, что растения-хозяева различались по доступности в них флавина для бактерий. Эти примеры генотипической изменчивости взяты из немногих работ, в которых мутанты бактерий испытывались на ряде генотипов хозяев. Такая проверка в генетических исследованиях *Rhizobium* пока проводится нечасто.

СВЯЗЫВАНИЕ АЗОТА

Симбиоз *Rhizobium* с бобовыми имеет важное значение для сельского хозяйства: благодаря связыванию азота воздуха растения с клубеньками почти не требуют для роста почвенного азота. Поскольку фиксация азота требует больших затрат энергии, урожайность культур удалось бы повысить, если бы были найдены штаммы ризобий или сорта бобовых, способные более эффективно использовать продукты фотосинтеза для образования и ассимиляции аммония. В настоящее время единственно возможный прямой генетический подход к получению более эффективных штаммов ризобий — это манипуляция генами, контролирующими поглощение водорода (см. раздел 13). Улучшенные штаммы ризобий для инокуляции почв, вероятно, будут созданы на основе отбора форм, которые более эффективно стимулируют рост растений. Существующие методы оценки эффективности симбиотических ассоциаций несовершенны, что затрудняет изучение генетики «эффективности» бактерий. С этой проблемой сталкиваются и при изучении роли растения в симбиозе, которая, по-видимому, имеет первостепенное значение. Поэтому вполне правомерным представляется вопрос о том, почему так много времени уделяется изучению генетики *Rhizobium*, если эффективность взаимодействия между симбионтами в большей мере определяется растением?

ПЕРСПЕКТИВЫ

Rhizobium и *Agrobacterium* — близкородственные виды (о чем идет речь в данной книге), поэтому изучению генетики плазмид *Rhizobium*, несомненно, способствовали и, по-видимому, будут способствовать результаты работы с *Agrobacterium*. Можно ожидать огромных успехов в создании новых видов, связывающих молекулярный азот, путем встраивания в геном растений генов, контролирующих фиксацию азота, с использованием Т-ДНК *Agrobacterium*, однако необходимо преодолеть трудности, связанные с регулирующей нитрогеназой активности и чрезвычайно высокой чувствительностью этого фермента к кислороду.

Можно ожидать успеха в изучении генетики симбиоза, однако выявление факторов, определяющих эффективность связывания азота в клубеньках и взаимоотношений между ризобиями в почве, потребует разработки новых методологических подходов. Поскольку целью генетических манипуляций является создание улучшенных штаммов *Rhizobium* для инокуляции почвы, испытание генетически улучшенных форм будет производиться в полевых условиях. При этом необходимо уделить большое внимание разработке методов оценки хозяйственной ценности штаммов, что в настоящее время в больших масштабах трудно выполнимо. Таким образом, главная задача генетиков в будущем — постановка экспериментов по идентификации полезных функций и оценка их роли и значения. Качество и размах генетических исследований с *Rhizo-*

bium и *Agrobacterium*, результаты которых представлены в книге, свидетельствуют о возможности создания улучшенных штаммов *Rhizobium* с помощью генетических манипуляций и увеличения мирового производства бобовых культур на основе исследования растений-хозяев и инокулянтов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ames P, Bergman K (1981) Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 148:728—729
2. Beringer JE, Johnston AWB (1978) The genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: Isotopes in biological dinitrogen fixation. Int Atom Energ Ag, Vienna, p 27—39
3. Beringer JE, Johnston AWB, Kondorosi A (1982) Genetic maps of *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* and *R. trifolii*. Genet Maps 2:130—131
4. Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. J Gen Microbiol 120:421—429
5. Brockwell J, Dudman WF, Gibson AH, Hely FW, Robinson AC (1968) An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. Transact 9th Int Congr Soil Sci, vol II, pp 103—114
6. Bromfield ESP, Jones GD (1980) Studies of double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red and white clover grown in soil agar. Ann Appl Biol 94:51—59
7. Currier WW (1980) Chemotaxis of a Birdsfoot Trefoil strain of *Rhizobium* to simple sugars. FEMS Microbiol Lett 8:43—46
8. Dudman WF, Brockwell J (1968) Ecological studies of root nodule bacteria introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immune diffusion serology. Aust J Agric Res 19:739—747
9. Gaworzewska ET, Carlile MJ (1982) Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J Gen Microbiol 128:1179—1188.
10. Götz R, Limmer N, Ober K, Schmitt R (1982) Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. J Gen Microbiol 128:789—798
11. Napoli C, Albersheim P (1980) Infection and nodulation of clover by nonmotile *Rhizobium trifolii* J Bacteriol 141:979—980
12. Nutman PS (1969) Genetics of symbiosis and nitrogen fixation in legumes. Proc R Soc London Ser B 156:122—137
13. Pankhurst CE, Schwinghamer EA, Thorne SW, Bergersen FJ (1974) The flavin content of clovers relative to symbiosis with a riboflavin-requiring mutant of *Rhizobium trifolii* Plant Physiol 53:198—205
14. Parker CA, Trinick MJ, Chatel DL (1977) Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. In: Hardy RWF, Gibson AH (eds) A treatise on dinitrogen fixation, Sect. IV. Wiley Interscience, New York

3. ТРОПА ОПИНОВ

Ж. ТАМПЕ и А. ПТИ •

Тропа опинов — это путь, открытый в 1956 г. Ж. Морелем и К. Лиоре. Начавшись с обнаружения в культурах тканей корончатых галлов специфических соединений, которые теперь называют опинами, эта тропа привела к описанию на молекулярном уровне взаимоотношений, устанавливающихся в корончатых галлах, между *Agrobacterium tumefaciens* и растением-хозяином.

Причина, по которой эта статья получила такое несколько неожиданное название, кроется в том, что один из наших коллег сравнил исследования, благодаря которым мы внесли свой вклад в описание системы корончатых галлов, с хождением по тропинке в стране, где почти все ездят на мощных автомобилях по автостраде (P. Schaeffer, личное сообщение).

В этой статье приведены результаты наших исследований опинов и последние достижения в данной области. Но, поскольку они видятся нам с тропы опинов, вполне возможно, что некоторые специалисты не узнают ландшафта, представления о котором они получили, бросая взгляд с автострады.

РАННИЙ ЭТАП ИЗУЧЕНИЯ ОПИНОВ

Как указано выше, первые шаги по тропе опинов были сделаны в 1956 г., когда Морель [46] и Лиоре [34] независимо сообщили на заседании Французского общества физиологов растений, что они обнаружили неизвестные специфические соединения в культурах ткани корончатых галлов. За этими предварительными сообщениями последовала идентификация лизопина [1], октопина [38] и октопиновой кислоты [39].

В середине 60-х годов значение синтеза этих производных аминокислот было далеко не ясно. Первоначальное утверждение Лиоре [34, 35] о том, что лизопин специфичен для ткани корончатых галлов, оспаривалось [63], и сам Лиоре в заключении статьи о физиологической роли лизопина в тканях корончатых галлов пришел к выводу, что лизопин — это, по-видимому, природный метаболит, присутствующий и в нормальных тканях [36]. Однако сотрудники лаборатории Мореля были уверены, что в растительном царстве октопин является специфическим маркером клеток корон-

* J. Tempé, A. Petit, Group de Recherches sur les Interactions entre Microorganismes et Plantes, Institut de Microbiologie, Bâtiment 409, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay, France.

чатых галлов. Экстракты из тканей корончатых галлов анализировали с помощью ионообменной хроматографии, характеризующейся высокой разрешающей способностью, и октопин обнаруживали в элюате по времени удерживания и цветной реакции, специфичной для производных гуанидина — аргинина и октопина [41, 66]. Используемый гуанидиновый анализатор отличался точностью, надежностью и чувствительностью. Это оборудование использовалось как для обычных анализов, так и для исследования экстрактов из тканей, меченных радиоактивными предшественниками октопина. Так, инкубация тканей корончатых галлов с ^{14}C -аргинином всегда приводила к высокому включению метки в октопин, тогда как в аналогичных опытах с нормальными тканями радиоактивный октопин не обнаруживался [19]. Поэтому мы были убеждены, что если октопин и присутствует в нормальных тканях, его концентрация заведомо ниже 0,1% той, которая обнаружена в тканях корончатых галлов, составляющей порядка 2 мкмоль/г сухой массы.

В то время Морель и Гольдман-Менаже уделяли много внимания установлению структуры другого производного аргинина, который позднее был назван ими нопалином. Он присутствовал в больших количествах (до 60 мкмоль/г сухой массы) в тканях корончатых галлов из *Opuntia vulgaris* (по-французски «нопал»). Этот штамм культуры ткани корончатого галла был исключительным в том отношении, что лишь он один не содержал октопина [40]. В то время в качестве рабочей была выдвинута гипотеза, что это наблюдение отражает метаболические различия между растениями толстянковых, такими, как *Opuntia* [42], и другими видами растений [19, 47].

Имея в своем распоряжении гуанидиновый анализатор, Тампе изучал ткани корончатых галлов различного происхождения в надежде обнаружить связь между концентрацией октопина и ростовыми характеристиками ткани. Идея экспериментов возникла в ходе дискуссии с А. Брауном, посетившим его в 1967 г. Эксперименты планировались с целью проверки гипотезы Мореля о том, что октопин синтезируется вследствие метаболических изменений, происходящих в ходе трансформации, приводящей к образованию опухоли. Если бы это было так, то концентрация октопина в тканях корончатых галлов могла отражать степень трансформации тканей. Браун предоставил нам ткани с различным характером роста. Первым проанализированным образцом была линия тератомы Т37, изолированная из опухоли, индуцированной бактериальным штаммом Т37. Она непрерывно продуцировала почки, которые развивались в побеги с листьями. Брауну удалось восстановить из этой линии нормальные растения [5]. Мы ожидали найти концентрационный градиент октопина, направленный от сердцевины каллуса к его наружным частям, побегам и листьям, и в целом пониженную в сравнении с недифференцированными линиями концентрацию октопина. Вместо этого были обнаружены большие количества нопалина.

Помимо опровержения наших гипотез, полученный результат показал, что тип аргининового производного, присутствующего в корончатых галлах, скорее всего, определяется штаммом *Agrobacterium tumefaciens*, взятым для инокуляции. Это предположение подтвердилось при анализе экстрактов из опухолей, индуцированных на различных растениях штаммами В6 или Т37. Все опухоли, образовавшиеся на растениях, включая толстянковых, инокулированных клетками штамма В6, содержали октопин, а опухоли на растениях, инокулированных штаммом Т37,— нопалин [17]. Это наблюдение свидетельствовало в пользу того, что фенотип клеток корончатого галла определяется бактериальным геномом.

Описанные результаты были затем дополнены наблюдениями над другими штаммами *A. tumefaciens*, которые, очевидно, можно было характеризовать типом аргининового производного, присутствующего в опухолях, которые эти штаммы продуцировали [50]. Чтобы понять значение наших наблюдений, мы попытались сопоставить данные по содержанию гуанидина в корончатых галлах с фенотипами бактерий. После нескольких безуспешных попыток стимулировать различные штаммы к синтезу октопина или нопалина мы стали изучать распад этих соединений в бактериях. Поскольку у разложения лизопина клетками *Agrobacterium* уже сообщалось [31], для нас не было неожиданностью, что наши штаммы расщепляют октопин или нопалин. Новым было то, что синтез октопина в корончатых галлах и его разложение бактериями проявляли ту же самую штаммовую специфичность: штамм, катаболизирующий нопалин, индуцирует опухоли, содержащие нопалин, у всех восприимчивых видов растений. Точно так же, если некоторый бактериальный штамм катаболизирует октопин, он индуцирует опухоли, содержащие октопин. Поэтому, зная фенотип бактерий в отношении катаболизма октопина или нопалина, можно предсказать фенотип опухоли. Итак, нам удалось подтвердить, что бактериальный геном определяет фенотип корончатых галлов, а также установить биохимическую связь между штаммами *A. tumefaciens* и клетками корончатых галлов. На основании этих наблюдений мы сделали вывод о том, что «В процессе трансформации, приводящей к образованию опухоли, бактериальная ферментная система, по-видимому, переносится в растительную клетку, что предполагает присутствие части бактериального генома, наделенного генетической непрерывностью, и его выражение в трансформированных клетках корончатых галлов» [50].

Затем штаммы *A. tumefaciens* были разбиты на классы в соответствии с типом их опиона (табл. 3.1). Мы установили, что большинство из них относилось к октопиновому или нопалиновому типу. Среди немногих штаммов, не соответствовавших этой классификации, некоторые, возможно, относились к смешанному типу, однако, скорее всего, они были артефактом. Другие штаммы не катаболизировали октопин или нопалин, и опухоли, индуцированные этими штаммами, не содержали данные опионы. Позднее они были названы штаммами нулевого типа [62].

3.1. Корреляция между синтезом опинов в корончатых галлах и расщеплением опинов клетками *Agrobacterium tumefaciens*

Штамм	Октопин		Нопалин		Штамм	Октопин		Нопалин	
	синтез	расщепление	синтез	расщепление		синтез	расщепление	синтез	расщепление
A6	+	+	—	—	Incense cedar	—	—	+	+
A281	—	—	—	—	K10	+	+	—	—
ACH5	+	+	—	—	K15/73	—	—	—	—
Anthemis	—	—	+	—	<i>A. rubi</i>	—	—	+	+
AT1	—	—	—	—	R10	+	+	—	—
AT4	—	—	—	—	SP	+	+	—	—
B2	+	+	—	—	S353	—	—	+	+
B6	+	+	—	—	S379	+	+	—	—
B78	—	—	+	+	T37	—	—	+	+
B91	+	+	—	—	W1	+	+	—	—
B6542	—	—	—	—	IBNV6**	—	—	—	—
CHR3	—	—	+	+	IBV7	—	—	+	+
C58	—	—	+	+	9P	—	—	+	+
Delft	—	—	+	+	42IV	—	—	+	+
Eu6*	—	—	—	+	61	+	+	—	—
H5	—	—	+	+	71	—	—	+	+
H100	—	—	+	+	181*	—	—	—	+
					1001	+	+	—	—
					15955	+	+	—	—

* 181 и Eu6—штаммы, исключительные в том отношении, что они расщепляют нопалин, но индуцируемые ими опухоли не содержат идентифицированных опинов.

** Авирулентный штамм.

Мы изучали также путь расщепления октопиновым штаммом B6 октопина и обнаружили, что первым продуктом этого процесса является аргинин, а это указывало на противоположный характер путей распада и синтеза октопина в опухолях. Это наблюдение послужило основой для следующей рабочей гипотезы: мы предположили, что в ходе трансформации, приводящей к образованию опухоли, содержащиеся в бактериальном геноме гены, контролирующие расщепление, переносятся в растительную клетку, в которой их выражение приводит к синтезу опиона. Главное достоинство этой гипотезы заключалось в том, что в случае ее справедливости легко получить доказательство переноса генов в процессе индукции корончатых галлов: мы ожидали, что среди бактериальных мутантов, дефектных по расщеплению опиона, некоторые утратят способность синтезировать опион в опухолях.

Браун [4] и Кляйн [30] уже давно предположили, что трансформация растительных клеток в корончатый галл может включать перенос ДНК от бактерии в клетку растения. В 60-е годы многие исследователи надеялись подтвердить эту гипотезу биохимическими методами, такими, как гибридизация нуклеиновых кислот или иммунохимия [43, 54, 58, 59, 60]. Однако данные, полу-

ченными такими методами, оспаривались [2, 7, 11, 37], и возникли серьезные сомнения в справедливости полученных ранее результатов, включая те, которые касались специфичности опинов как биохимических маркеров для клеток корончатых галлов [23, 72]. Даже сам Браун, ранние работы которого послужили основой для выдвижения идеи о том, что трансформация растительных клеток в корончатые галлы может быть результатом переноса ДНК [4], стал яростным сторонником концепции, согласно которой корончатые галлы и раковые опухоли вообще возникают вследствие эпигенетических изменений, т. е. изменений в выражении генетической информации, а не самой генетической информации [6].

Т1-ПЛАЗМИДЫ И ОПИНЫ

При такой безысходной перспективе в исследовании опинов открытие Т1-плазмид [77] в лаборатории Дж. Шелла в Генте явилось лучом надежды, озарившим проблему корончатых галлов новым светом; это открытие принесло новые подходы к проблеме и методы решения. На тропе опинов, как и во всей области изучения корончатых галлов, Т1-плазмиды стали тем пробным камнем, с помощью которого оказалось возможным оценить все прежние результаты. Наши собственные данные, подтвержденные Бомхоффом в лаборатории Схильперорта [2], обрели прочную основу, когда было показано, что гены, участвующие в синтезе и расщеплении опинов, локализованы на Т1-плазмиде [3, 44]. Тот факт, что бактериальные гены, определяющие опиновый тип опухолей, расположены на том же самом генетическом элементе, что и детерминанты патогенности, явился хорошим подтверждением гипотезы переноса генов.

Были выделены мутанты по Т1-плазмиде, у которых затронут октопиновый катаболизм. Все такие мутанты, остававшиеся вирулентными, индуцировали образование опухолей, которые содержали октопин [29, 44, 49], тем самым опровергая нашу рабочую гипотезу, согласно которой в клетках растения и бактерий функционируют одни и те же гены. Генетический подход, которым мы воспользовались для доказательства гипотезы переноса генов, оказался неплотодотворным, однако это не значит, что гипотеза неверна.

В конечном итоге опыты по гибридизации рестрикционных фрагментов Т1-плазмиды, взятых в качестве проб, выполненные М. Чилтон и ее коллегами в Сиэтле, явились решающим доказательством справедливости гипотезы переноса генов [8]. Эти результаты были вскоре подтверждены [32, 56, 57, 71], и тем самым было окончательно доказано существование Т-ДНК (Transferred DNA). Инсерционный мутагенез [22], транскрипционные опыты [75], трансляция *in vitro* [48, 61], клонирование и секвенирование ДНК (Де Грее и др., *в печати*) не оставили никаких сомнений в том, что ферменты, ответственные за синтез октопина и нопалина в клетках корончатых галлов, кодируются генами Т1-плазмиды, стабильно интегрированными в геном клетки растения.

КОНЦЕПЦИЯ ОПИНОВ

Возникает вопрос, каков биологический смысл синтеза опинов в клетках корончатых галлов и расщепления опинов бактериями? В рамках новой теории, получившей название концепции опинов, сделана попытка согласовать данные о синтезе и распаде опинов с наблюдениями Керра [25, 26] по передаче патогенности от штаммов *Agrobacterium* в корончатые галлы и открытием конъюгативного характера Ti-плазмид, конъюгационная активность которых индуцируется опинами [52]. Эта теория возникла на основании дискуссий главным образом между Дж. Шеллом, А. Керром и Ж. Тампе.

Концепция опинов [21, 51, 68] постулирует, что во взаимоотношениях бактерий с растениями опины выступают как химические медиаторы паразитизма, роль которых весьма существенна. Другими словами, главной особенностью Ti-плазмид являются функции, связанные с опинами, посредством которых плазмидам и их бактериям-хозяевам удается использовать продукты метаболизма растений для удовлетворения своих собственных потребностей. Функции синтеза опинов служат единственной цели — подчинению растения-хозяина для продуцирования опинов, которые сами являются специфическими субстратами функций расщепления опинов. Одновременное выражение этих дополняющих друг друга функций дает энергию, необходимую для размножения Ti-плазмид.

Схема генетической колонизации, сформулированная Шеллом, а также Ван Монтегю и др. [56, 57], конкретизирует концепцию опинов: ее реализация осуществляется путем переноса генов Ti-плазмиды из бактерии в геном растения.

Развитие концепции опинов

Поскольку успехи на тропе опинов были достигнуты при движении в ложном направлении, мы приступили к проверке обоснованности концепции опинов не без изрядной доли скепсиса. Помимо любопытства, одной из причин стремления все это понять было желание развенчать теорию, если она того заслуживает.

Теоретически, наилучшим способом оценки обоснованности концепции опинов было бы проведение экологических исследований. Если концепция верна, то на ее основе можно было бы предсказать эволюцию бактериальных популяций в почве. Например, в ситуации, в которой патогенные функции Ti-плазмиды могут быть выражены, мутантный штамм, утративший функции катаболизма опинов, должен обладать меньшей конкурентоспособностью, чем изогенный штамм дикого типа. Было бы нетрудно придумать соответствующие эксперименты для проверки подобных предсказаний. Однако мы сознавали, что, будучи незнакомыми с исследованиями такого рода, мы не сумеем разработать методические приемы, которые обеспечат получение достоверных результатов. Поэтому было решено избрать другой путь: подступиться к опи-

нам в таких системах, в которых они еще не были описаны. По сравнению с экологическим такой подход обладает дополнительным преимуществом — он более динамичен, поскольку в случае получения положительных результатов мы не только подтвердили бы концепцию опинов, но и расширили бы наши представления о других системах.

Опины присутствуют в корончатых галлах нулевого типа

Как уже упоминалось, помимо опухолей октопинового и нопаинового типа и бактерий, послуживших экспериментальным объектом при создании концепции опинов, были также идентифицированы опухоли так называемого нулевого типа [62], а также штаммы бактерий, индуцирующие опухоли, в которых не содержится октопин или нопаин. Подобные штаммы не расщепляют эти опины.

Было решено работать со штаммом Во542, поскольку ранее было показано, что он способен эффективно передавать свою плазмиду реципиенту в процессе скрещиваний *in planta* (внутри опухоли) [62]. В таких скрещиваниях, впервые описанных Керром [25, 26], опины могут играть двоякую роль — как индукторы конъюгации [52] и как селективные питательные компоненты, обеспечивающие преимущества трансконъюгантам относительно реципиентных клеток.

В опухолях, индуцированных штаммом Во542 или его трансконъюгантом А281 [62], велись поиски соединений, которые могли бы играть роль опинов. Такие соединения должны были быть опухолеспецифичными и в то же время служить катаболическими субстратами для трансконъюганта А281, но не для штамма С58С1, не содержащего Тi-плазмиды. Соответственно экстракты опухоли, содержащие опины, при добавке к культуральной среде в качестве единственного питательного компонента должны были способствовать улучшению роста трансконъюгантного штамма по сравнению со штаммом С58С1. Подобное дифференциальное влияние на рост не должно было обнаруживаться при использовании экстрактов из нормальных тканей. И действительно, иногда можно было заметить небольшие различия в характере роста, если в питательную среду, состоящую из минеральных элементов и инокулированную клетками А281 или С58С1, вносились неочищенные экстракты опухоли. Это, однако, происходило не всегда, и даже если наблюдались положительные различия в характере роста, они обнаруживались лишь у нескольких процентов массы клеток. Логично было предположить, что если опины содержатся в экстрактах, истощенная среда, к которой они были добавлены и на которой выращивали штамм без Тi-плазмиды, должна была ими обогатиться. Поэтому мы очистили органические компоненты среды после выращивания на ней бактерий с помощью ионообменной хроматографии и ввели их в свежую среду. Эффект дифференциального роста стал в высокой степени воспроизводимым. Поэтому

культивирование С58С1 на неочищенном экстракте способствовало эффективной очистке специфических ростовых факторов. Напротив, нормальные ткани, обработанные таким же образом, не содержали ростовых субстратов, специфичных для Тi-плазмиды.

Эти результаты подтвердили предположение о том, что опухоли нулевого типа обладают опиновой активностью [21]. Ионобменная хроматография аминокислотной фракции позволила получить очищенный материал в количестве, достаточном для его химического и биологического описания. Было показано, что неизвестный опин является эффективным ростовым субстратом для штаммов как нулевого, так и октопинового типов, но не для нопапиновых штаммов. Он оказался идентичным агропину (рис. 3.1) — новому опину, выделенному из опухолей октопинового типа [16, 65].

Недавно содержащиеся агропин опухоли были исследованы более детально. Оказалось, что в общем случае они содержат три других опина — маннопин, маннопиновую кислоту и агропиновую кислоту (рис. 3.1), имеющих такой же, как у агропина, углеродно-азотный скелет (Даль и др., *готовится к печати*).

Агроцинопины и биологический контроль корончатых галлов

Еще один вклад в развитие концепции опинов был сделан благодаря работе Керра по биологической борьбе с корончатыми галлами. Было показано [27], что можно претворить их образование путем обработки восприимчивых растений суспензией неонкогенного штамма К84 *A. radiobacter*. Метод эффективен и характеризуется высокой степенью воспроизводимости, если в качестве патогена использовать штамм нопапинового типа. В основе механизма биоконтроля лежит синтез штаммом К84 микроцина, названного агроцином 84 [27, 55]. Было показано, что рост патогена подавляется агроцином 84 и что ген, ответственный за чувствительность к агроцину, локализован на Тi-плазмиде нопапинового типа [14]. Эллис и Мерфи считали маловероятным, что функция самоубийства, подобная чувствительности к агроцину 84, закодирована в плазмиде. С открытием новых опинов в различных видах опухолей вывод о том, что агроцин 84 — это токсичный субстрат для поглощения или катаболизма еще неизвестного опина, стал звучать несколько тривиально. Действительно, Эллис и Мерфи [12] показали, что нопапиновые опухоли содержат новый класс опинов, которые они назвали агроцинопинами и которые, по-видимому, являются нормальными субстратами для системы, определяющей чувствительность к агроцину, которая закодирована в нопапиновой Тi-плазмиде. Выяснилось, что агроцинопин А, обнаруженный в нопапиновых опухолях, повышает чувствительность к агроцину 84 у штаммов, содержащих нопапиновую Тi-плазмиду. Такое возрастание чувствительности обусловлено индукцией системы активного транспорта, использующей агроцин 84 и агроцинопин А в качестве субстратов. Чувствительность неиндуцированных нопапино-

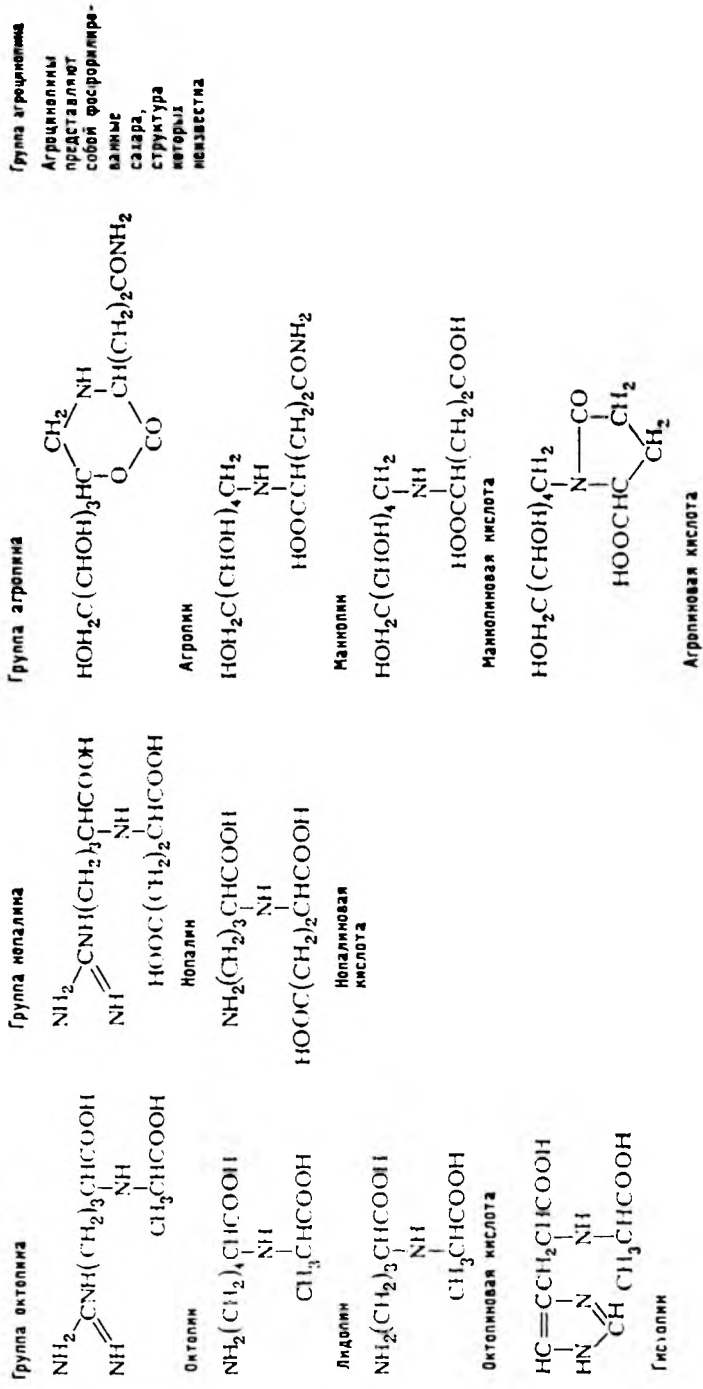


Рис. 3.1. Структурные формулы олинов [1, 10, 15, 18, 24, 38, 39, 53, 65]

вых штаммов к агроцину 84 связана с частичной конститутивностью транспортной системы.

В опухолях, индуцированных штаммами агропинового типа Во542 и А281, было найдено другое вещество, взаимодействующее с агроцином 84. Действие этого соединения, названного агроцинопином С, антагонистично по отношению к токсическому эффекту агроцина 84 для штаммов нопалинового типа. И наоборот, оно индуцирует чувствительность к агроцину устойчивого в других отношениях штамма А281. Штамм Во542, который был донором Ti-плазмиды для штамма А281, устойчив к агроцину 84 даже в присутствии агроцинопина С, хотя он должен нести детерминанты чувствительности к агроцину 84, поскольку они обнаруживаются у его трансконъюганта А281. Мы установили, что Во542 продуцирует микроцин, весьма сходный, если не идентичный, с агроцином 84. Поэтому вполне вероятно, что иммунитет штамма Во542 к агроцину 84 связан с образованием в нем молекул микроцина.

При изучении штамма *A. radiobacter* К84, продуцента агроцина 84, было обнаружено, что он может использовать нопалин в качестве единственного источника углерода и азота [28] и что эта катаболическая функция определяется плазмидой. Штамм 84 выделен из почвы, взятой вблизи персиковых деревьев с корончатыми галлами нопалинового типа. Возникает вопрос, не является ли данный штамм своеобразным «суперпаразитом», который, не обладая способностью индуцировать синтез опинов, поскольку непатогенен, тем не менее может получать к ним доступ, контролируя посредством образования агроцина 84 размножение патогенного штамма и, следовательно, утилизацию им нопалина, синтезируемого трансформированными клетками растения. Несмотря на то что еще нет экспериментальных данных, подтверждающих эту гипотезу, мы сочли нужным упомянуть ее здесь, поскольку она хорошо согласуется с концепцией опинов. Обоснованию развиваемой теории, вероятно, способствовало бы и проведение экологических исследований.

Роль опинов в распространении Ti-плазмид

Распространение плазмиды в бактериальной популяции может обеспечиваться двумя основными механизмами.

1. Повышенной скоростью роста штамма, если плазида, которую он несет, определяет функции, обеспечивающие ускоренный рост. Так, бактерии, содержащие плазмиды с катаболическими функциями, размножаются с большей скоростью в среде, в которой субстрат катаболической функции плазмиды составляет значительную часть доступных питательных веществ.

2. Конъюгационной активностью плазмиды, способствующей ее расселению в бактериальной популяции.

Опины, по-видимому, вовлечены в оба механизма, поскольку их присутствие дает селективное преимущество бактериям, несущим

щим Ti-плазмиду, и они индуцируют конъюгационную активность последней.

Очевидно, что оба эти механизма могут в значительной мере способствовать распространению Ti-плазмид в почвенных популяциях *Agrobacterium* при наличии восприимчивых растений, несущих опухоль. Однако и в данном случае нет никаких экологических данных, чтобы оценить обоснованность выдвигаемых предположений.

Идея о том, что для распространения Ti-плазмид могут быть существенны как катаболические функции, так и индукция конъюгационных функций, подтверждается тем фактом, что у всех изученных типов корончатых галлов охарактеризованы как опины, обеспечивающие катаболические функции, так и опины, индуцирующие конъюгацию (табл. 3.2).

3.2. Опиновые типы корончатых галлов и штаммов

A. tumefaciens [13, 52, 67]

Опиновый тип опухоли (примеры штаммов)	Катаболизируемые опины	Конъюгативные опины
Октопиновый (A6, B6, R10, AC15, 15955)	Октопин, лизопин, октопиновая кислота, гистопин, агролин, агропиновая кислота, маннопин, маннопиновая кислота	Октопин
Нопалиновый (C58, T37, N100)	Нопалин, нопалиновая кислота, агроцинопин A*	Агроцинопин A
Агропиновый (Bo542, AT1)	Агропин, агропиновая кислота, маннопин, маннопиновая кислота, агроцинопин C*	Агроцинопин C

* Агроцинопины В и D, обнаруженные соответственно в экстрактах нопалиновых и агропиновых опухолей, могут являться продуктами расщепления агроцинопинов А и С. Они не упомянуты здесь, поскольку неизвестно, действительно ли они присутствуют в опухолях (Эдлис, личное сообщение). Агропиновая кислота, которая также представляет собой продукт расщепления агропина и маннопина, по-видимому, образуется как *in vivo*, так и *in vitro*, поэтому она включена в список.

В связи с постулируемой ролью опинов в природе интересно отметить, что опины, индуцирующие конъюгационную активность, всегда содержатся в меньших количествах, чем опины, играющие лишь катаболическую роль.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ ОПИНОВ НА СИСТЕМУ БОРОДАТЫХ КОРНЕЙ

Род *Agrobacterium* включает два основных патогенных вида бактерий. Это *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*, причем последний ответствен за болезнь, получившую название «бородатые корни», которая проявляется в отрастании у двудольных растений в точке инокуляции многочисленных вторичных корней (рис. 3.2). Участие плазмид в развитии этого заболевания было предположено Муром и др. [45] и продемонстрировано Уэйтом и Нестером [73].

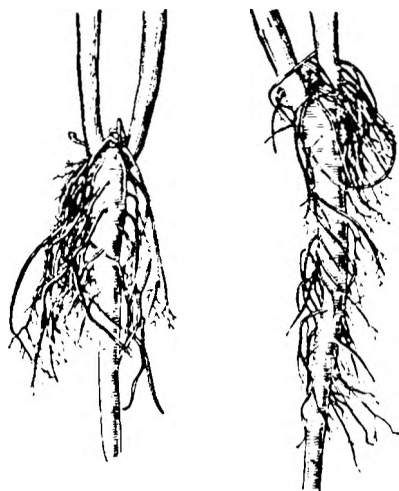


Рис. 3.2. Болезнь бородатые корни у *Kalanchoe tubiflora*. Снимок сделан через 7 мес после инокуляции:

слева — корни, инокулированные штаммом *A. rhizogenes* 15834, справа — корни, инокулированные штаммом 8196.

Эти авторы показали, что большинство штаммов *A. rhizogenes* несет плазмиды. У двух из изучавшихся штаммов наибольшая по размеру плазида представляет коинтегра́т двух меньших. Как оказалось, плазида промежуточного размера несет гены патогенности. К аналогичным выводам исследователи пришли и при изучении других штаммов этого вида [9].

Одной из главных причин, по которой мы остановили выбор на данной системе для продолжения работы над концепцией опинов, послужил тот факт, что, как показано для *A. tumefaciens*, патогенность *A. rhizogenes* может передаваться непатогенным видам рода *Agrobacterium* путем скрещивания *in planta* [45]. Вследствие аналогии с предыдущим случаем можно предположить участие опинов и в этой системе.

Идентификация опинов в материале бородатых корней не составила труда, поскольку было известно, что штаммы *A. rhizogenes* для своего роста могут использовать опины семейства агропинов [70]. Анализ экстрактов из тканей бородатых корней, индуцированных набором из шести бактериальных штаммов, показал, что по содержанию в них опинов последние распадаются на два класса (табл. 3.3) [53]. Ткань бородатых корней агропинового типа сходна в этом отношении с соответствующими корончатыми галлами: она содержит все четыре опи́на семейства агропинов (рис. 3.1) и, кроме того, агроцинопин, который, по-видимому, идентичен агроцинопину А. Для бородатых корней маннопинового типа эквивалента в системе корончатых галлов пока не найдено. К опи́нам, связанным с этим типом тканей, относятся следующие: маннопин, маннопиновая кислота, агропиновая кислота и агроцинопин, сходный с агроцинопинном С. Были изучены катаболические свойства штаммов *A. rhizogenes* относительно опинов агропинового семейства (табл. 3.3). Результаты этого исследования полностью соответствовали тому факту, что эти вещества представляют собой опи́ны, и поэтому свидетельствовали в пользу концепции опинов. Правда, было обнаружено одно отличие, которое мы теперь обсудим. При изучении катаболических свойств штаммов агропинового типа было установлено, что один из наших трех штаммов (штамм НР1) мог катаболизировать лишь агропин, хотя он

3.3. Опиновые типы тканей бородатых корней и штаммов *A. rhizogenes* [53]

Штамм	Опины, обнаруженные в бородатых корнях	Опины, расщепляемые штаммом
I. Агропиновый тип A4, 15834	Агропин, маннопин, маннопиновая кислота, агропиновая кислота, агроцинолин А*	Агропин, маннопин, маннопиновая кислота, агропиновая кислота
HRI	Агропин, маннопин, маннопиновая кислота, агропиновая кислота, агроцинолин?*	Агропин
II. Маннопиновый тип TR7, TR101, 8196	Маннопин, маннопиновая кислота, агропиновая кислота, агроцинолин С*	Маннопин, маннопиновая кислота (агропиновзая кислота)***

* Агропины обнаружены в экстрактах из культур бородатых корней с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге. Они были идентифицированы химическими и биологическими методами как агроцинолин А в корнях агропинового типа и агроцинолин С в корнях маннопинового типа. С агроцинолинами из бородатых корней опыты по биологическому расщеплению не проводились.

** Анализ на содержание агроцинолинов не проводился.

*** На этом субстрате штамм 8196 рос плохо, а TR7 и TR101 не росли совсем; однако после 3—4 нед инкубации появились мутанты, способные утилизировать этот субстрат.

вызывает формирование корней, содержащих все четыре опиона этого семейства.

Причина такого поведения этого штамма выяснилась позже, когда мы изучали свойства коллекции трансконъюгантов агропиновых штаммов. Было показано, что если вести отбор по агропину, то трансконъюганты несут полный комплект плазмид донорного штамма или только плазмиду промежуточного размера. Вирулентны оба типа трансконъюгантов. Если же вести отбор по маннопину или маннопиновой кислоте, то вновь появляются два класса трансконъюгантов, один из которых содержит все плазмиды донора, тогда как другой несет лишь меньшую плазмиду. Трансконъюганты последнего класса авирулентны.

По катаболическим свойствам эти трансконъюганты распались на три класса (табл. 3.4). Трансконъюганты, содержавшие те же плазмиды, что и донор, могли катаболизировать все опины агропинового семейства; трансконъюганты с промежуточной плазмидой катаболизировали лишь агропин, в то время как трансконъюганты с меньшей плазмидой — маннопин, маннопиновую и агропиновую кислоты. Эти результаты согласуются с мнением, что у штаммов *A. rhizogenes* агропинового типа катаболические функции разобщены: одни детерминируются плазмидой вирулентности, а другие — меньшей плазмидой. Результаты анализа по Экхарду содержания плазмид у штамма дикого типа HRI, катаболизирующего только агропин, показали, что этот штамм обладает лишь одной плазмидой того же размера, что и плазида вирулентности у других штаммов. Поэтому необычное поведение штамма

3.4. Катаболические свойства трансконъюгантов, происходящих от штаммов *A. rhizogenes* [53]

Штамм	Состав плазмид	Вирулентность	Утилизация субстрата			
			агропин	маннопин	маннопиновая к-та	агропиновая к-та
C58C1 (pAr15834abc)	a, b, c	+	+	+	+	+
C58C1 (pAr15834a)	a	-	-	+	+	+
C58C1 (pAgA4a)	a	-	-	+	+	+
C58C1 (pAgA4b)	b-pRiA4	+	+	-	-	-
C58C1 (pAgA4abc)	a, b, c	+	+	+	+	+
C58C1 (pRiHRI)	pRiHRI	+	+	-	-	-
C58C1 (pAr8196b)	b-pRi8196	+	-	+	+	-

Примечание. + — нормальный рост; — — очень слабый рост.

HRI можно объяснить тем, что он несет лишь плазмиду вирулентности.

Для штаммов маннопинового типа ситуация оказалась проще, ибо все изучавшиеся функции, связанные с опинами, определяются плазмидой вирулентности, которая, как и у агропиновых штаммов, имеет промежуточный размер.

Не были изучены катаболизм агроцинопинов и их способность индуцировать конъюгационную активность плазмид *A. rhizogenes*.

Тот факт, что опины обнаружены во всех изучавшихся системах, служит хорошим подтверждением концепции опинов. Т-ДНК присутствует как в клетках бородачатых корней, так и в клетках корончатых галлов [9, 74, 76, Спано и др., в печати], что указывает на общность основных черт обеих систем, за исключением того, что у штаммов *A. rhizogenes* агропинового типа далеко не все катаболические функции детерминируются плазмидой вирулентности.

ПРИМЕНИМА ЛИ КОНЦЕПЦИЯ ОПИНОВ К ДРУГИМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМ БАКТЕРИИ С РАСТЕНИЯМИ?

Существуют ли другие системы взаимоотношений между растениями и бактериями, к которым применима концепция опинов? Поскольку в соответствии с этой концепцией биологический смысл синтеза опинов заключается в создании для патогена экологической ниши путем обеспечения химического окружения, дающего селективные преимущества штаммам, несущим патогенные плазмиды, было решено приступить к изучению таких взаимоотношений, в которых участие плазмид установлено или, по крайней мере, предполагается.

Выбор *Rhizobium meliloti* в качестве объекта для изучения представлялся достаточно очевидным в связи с тем, что:

Рис. 3.3. Гроздь клубеньков, образовавшихся на растении *Medicago sativa*, выращенном в условиях аэропоники и инокулированном штаммом *R. meliloti* L530. Снимок сделан через 6 мес после инокуляции (истинные размеры: 12 мм в поперечнике, сырая масса 370 мг).



— *Rhizobium* sp. и *Agrobacterium* sp. принадлежат к одному и тому же семейству;

— *Rhizobium meliloti* таксономически очень близок *Agrobacterium* [33].

Был проведен поиск опиподобных соединений в клубеньках люцерны, индуцированных различными штаммами *R. meliloti*. Одной из трудностей в работе было получение достаточного числа клубеньков.

Эта задача была решена выращиванием растений в условиях аэропоники [69]. Оказалось, что клубеньки люцерны (рис. 3.3), индуцированные штаммом *R. meliloti* L530, содержат соединение, не встречающееся в других частях растения и катаболизируемое этим штаммом, но не каким-либо другим из изучавшихся штаммов (рис. 3.4).

Биологическую очистку экстракта клубеньков проводили по методу, описанному для агропина, который извлекали из упоминавшихся ранее опухолей нулевого типа [21]. Катионная фракция, выделенная таким способом, могла служить единственным источником углерода и азота для штамма L530, но не для других штаммов *R. meliloti* (рис. 3.3).

На средах, содержащих эту фракцию, L530 растет особенно хорошо [69].

Очищенный экстракт содержит несколько компонентов, которые можно охарактеризовать с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге.

Один из этих компонентов выявить особенно легко, так как он реагирует с нитратом серебра, а катионов, реагирующих с этим низкомолекулярным веществом, в исследуемых экстрактах содержится не так много. Присутствие этого соединения легко обнаружить даже в неочищенных экстрактах (рис. 3.4). В очищенных же экстрактах выявлены соединения, дающие положительную реакцию с нингидрином и являющиеся специфическими катаболическими субстратами для L530 (рис. 3.5).



Рис. 3.4. Специфичное для клубеньков соединение, реагирующее с нитратом серебра, которое содержится в экстракте из клубеньков *M. sativa*. Высоковольтный электрофорез на бумаге при кислых значениях pH, окрашивание нитратом серебра:

a — экстракт из клубеньков; *b* — экстракт из корней; *a'* — анализ надосадочного слоя после биологической очистки экстракта из клубеньков; *b'* — анализ надосадочного слоя после биологической очистки экстракта из корней; 1—4 — органические катионы, содержащиеся в биологически очищенном экстракте из клубеньков, были выделены с помощью ионообменной хроматографии и введены в свежую культуральную среду в качестве единственного источника углерода и азота. Данная среда была инокулирована различными бактериальными штаммами, через 72 ч после инокуляции ее анализировали методом высоковольтного электрофореза на бумаге: 1 — инокуляция штаммом *A. tumefaciens* C58C1; 2 — инокуляция штаммом *R. meliloti* L530; 3 — инокуляция штаммом *R. meliloti* L532 под-22; 4 — без инокуляции; крайние левая и правая дорожки — стандарт, содержащий маннит (нейтральный маркер в точке старта), маннопин (M), агроципин (A).

КУДА ВЕДЕТ ТРОПА ОПИНОВ?

Хотя мы понимаем, что за нами остались некоторые неисследованные участки тропы опинов в области *Agrobacterium* (некоторые опухоли нулевого типа), мы намерены двигаться дальше в более спекулятивную область *Rhizobium*.

Мы отдаем себе отчет в том, что предстоит еще не только установить истинную принадлежность к опинам опиноподобных соединений, обнаруженных в клубеньках люцерны, но и продемонстрировать, что опины действительно играют в природе ту роль, которую отводит им концепция.

Понятно, что в этой области остро необходимы экологические исследования.

В отсутствие результатов подобных исследований самым веским аргументом в пользу концепции опинов является та роль, которую сыграли сами опины и концепция опинов в развитии исследований корончатых галлов и бородатых корней.

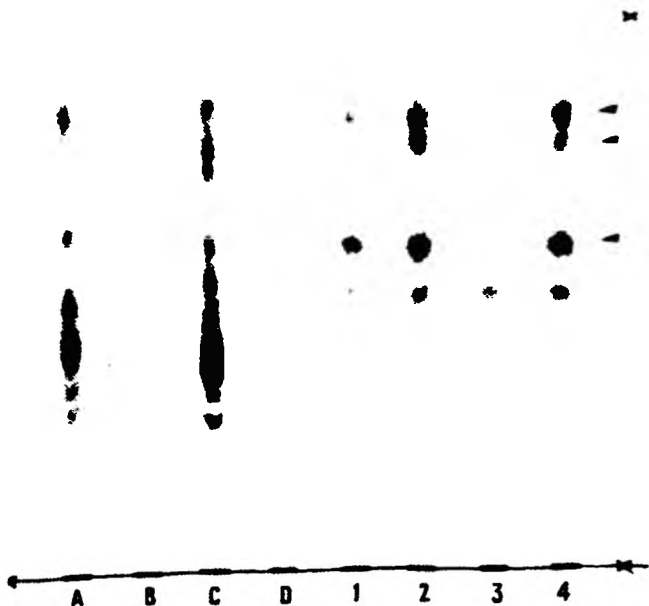


Рис. 3.5. Специфические для клубеньков соединения, реагирующие с нингидрином, содержащиеся в экстракте из клубеньков *M. sativa*. Экспериментальные условия те же, что и указанные в подписи к рисунку 3.4, за исключением окрашивания:

A — экстракт из корней; *B* — биологически очищенный экстракт из корней; *C* — экстракт из клубеньков; *D* — биологически очищенный экстракт из клубеньков; 1–4 — органические катионы, содержащиеся в биологически очищенном экстракте из клубеньков, были повторно введены в свежую культуральную среду в качестве единственного источника углерода и азота. Эта среда была инокулирована различными бактериальными штаммами и проанализирована через 72 ч после инокуляции; 1 — инокуляция штаммом *A. tumefaciens* C58C1; 2 — инокуляция штаммом *R. meliloti* L522; 3 — инокуляция штаммом *R. meliloti* L530; 4 — инокуляция штаммом *R. meliloti* 41; стрелки справа — положение наиболее заметных катаболических субстратов штамма *R. meliloti* L530, реагирующих с нингидрином.

Вследствие того что опины послужили важным инструментом в исследовании корончатых галлов, мы полагаем, что следует тщательно изучить возможность их участия также и во взаимоотношениях *Rhizobium* с бобовыми, поскольку это может не только способствовать развитию концепции опинов, но и оказать воздействие на дальнейший ход исследований в области симбиотического связывания атмосферного азота.

Распространение концепции опинов на систему взаимодействий между *Rhizobium* и бобовыми растениями, помимо создания новых инструментов исследования в данной области, может способствовать стимулированию изучения других систем взаимоотношений между растениями и микроорганизмами, а также разработке подходов к созданию искусственного симбиоза.

Благодарности. Работа субсидировалась дотациями Национального комитета по науке (Франция) и других организаций Франции и США. Мы признательны Р. Песано за просмотр рукописи.

1. Biemann K, Lioret C, Asselineau J, Lederer E, Polonski J (1960) Sur la structure chimique de la lysopine, nouvel acide aminé isolé des tissus de crown gall. Bull Soc Chim Fr 17:979—991
2. Bomhoff GH (1974) Studies on crown gall — a plant tumour. Investigations on protein composition and on the use of guanidine compounds as a marker for transformed cells. Ph D Thesis, Univ Leiden, Netherlands
3. Bomhoff GH, Klapwijk PM, Kester HC, Schilperoort RA, Hernalsteens JP, Schell J (1976) Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 145:177—181
4. Braun AC (1947) Thermal studies on the factors responsible for tumour initiation in crown gall. Am J Bot 34:234—240
5. Braun AC (1959) A demonstration of the recovery of the crown gall tumour cell with the use of complex tumours of single cell origin. Proc Natl Acad Sci USA 45:932—938
6. Braun AC (1974) The biology of cancer. Addison-Wesley, Reading, Mass
7. Chilton MD, Farrand SK, Eden F, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW (1975) Is there foreign DNA in crown gall tumour DNA? In: Markham, Davies, Hopwood, Horne (eds) Modification of the information content of plant cells. Elsevier/Horth Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, 297—311
8. Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11:263—271
9. Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host-plant root cells. Nature 295:432—434
10. Coxon DT, Davies AMC, Fenwick GR, Self R, Firmin JL, Lipkin D, Janes NF (1980) Agropine, a new amino acid derivative from crown gall tumours. Tetrahedron Lett 21:495—498
11. Dons JJM (1975) Crown gall — a plant tumour. Investigations on the nuclear DNA content and on the presence of *Agrobacterium tumefaciens* DNA and phage PS8 DNA in crown gall cells. Ph D Thesis, Univ Leyden, Netherlands
12. Ellis JG, Murphy PJ (1981) Four new opines from crown gall tumours their detection and properties. Mol Gen Genet 181:36—43
13. Ellis JG, Kerr A, Petit A, Tempé J (1982) Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids — The role of agrocinopines. Mol Gen Genet 186:269—274
14. Engler G, Holsters M, Montagu M Van, Schell J, Hernalsteens JP, Schilperoort RA (1975) Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens* Mol Gen Genet 138:345—349
15. Firmin JL, Fenwick RG (1977) N₂-(1-3-dicarboxypropyl) ornithine in crown gall tumours. Phytochemistry 16:761—762
16. Firmin JL, Fenwick RG (1978) Agropine — a major new plasmid-determined metabolite in crown gall tumours. Nature 276:842—844
17. Goldmann A, Tempé J, Morel G (1968) Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. CR Soc Biol 162:630—631
18. Goldmann A, Thomas DW, Morel G (1969) Sur la structure de la nopaline, métabolite anormal de certaines tumeurs de crown gall. CR Acad Sci (Paris) Ser D 268:852—854
19. Goldmann-Ménagé A (1970) Recherches sur le métabolisme azoté des tissus de crown gall cultivés in vitro. Ann Sci Nat Bot Biol Veg 11:223—310
20. Greve H De, Dhaese P, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1983) Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid encoded octopine synthase gene. J Mol Appl Genet (submitted)
21. Guyon P, Chilton MD, Petit A, Tempé J (1980) Agropine in "null type" crown gall tumours: evidence for the generality of the opine concept. Proc Natl Acad Sci USA 77:2693—2697
22. Hernalsteens JP, Vliet F Van, Beuckeleer M De, Depicker A, Engler G, Lemmers M, Holsters M, Montagu M Van, Schell J (1980) The *Agrobacterium*

- tumefaciens* Ti-plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* 287:654—656
23. Johnson R, Guderian RH, Eden F, Chilton MD, Gordon MP, Nester EW (1974) Detection and quantitation of octopine in normal plant tissue and in crown gall tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:536—539
 24. Kemp JD (1977) A new amino acid derivative present in crown gall tumour tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 74:862—868
 25. Kerr A (1969) Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*. *Nature* 223:1175—1176
 26. Kerr A (1971) Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium*. *Physiol Plant Pathol* 1:241—246
 27. Kerr A, Htay K (1974) Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol Plant Pathol* 4:37—44
 28. Kerr A, Roberts WP (1976) *Agrobacterium*: Correlation between and transfer of pathogenicity, octopine and nopaline metabolism and bacteriocin 84 sensitivity. *Physiol Plant Pathol* 9:205—211
 29. Klapwijk PM, Hooikaas PJJ, Kester HCM, Schilperoort RA, Roersch A (1976) Isolation and characterisation of *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in the utilization of octopine, octopinic acid and lysopine. *J Gen Microbiol* 96:155—163
 30. Klein RM (1954) Mechanisms of crown gall induction. *Brookhaven Symp Biol* No 6: Abnormal and pathological plant growth, pp 97—114
 31. Lejeune B, Jubier MF (1968) Etude de la dégradation de la lysopine par *Agrobacterium tumefaciens*. *CR Acad Sci (Paris) Ser D* 264:1803—1805
 32. Lemmers M, Beuckeleer M De, Holsters M, Zambrisky P, Depicker A, Herinalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1980) Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. *J Mol Biol* 144:353—376
 33. Ley J De, Bernaerts M, Rassel A, Guilmot A (1966) Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J Gen Microbiol* 43:7—17
 34. Lioret C (1956) Sur la mise en évidence d'un acide aminé non identifié particulier aux tissus de crown gall. *Bull Soc Fr Physiol Veg* 2:76
 35. Lioret C (1957) Les acides aminés libres des tissus de crown gall. Mise en évidence d'un acide aminé particulier à ces tissus. *CR Acad Sci (Paris)* 244:2171—2174
 36. Lioret C (1966) Recherches sur la signification physiologique de la lysopine dans les tissus de crown gall de scorsonère cultivés in vitro. *Physiol Veg* 4:89—103
 37. Loening UE, Butcher DN, Schuck W, Satirana ML (1975) Experiments on the homology between DNA from *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumour cells. In: Markham, Davies, Hopwood, Horne (eds) *Modification of the information content of plant cells*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, pp 297—311
 38. Ménagé A, Morel G (1964) Sur la présence d'octopine dans les tissus de crown gall. *CR Acad Sci (Paris)* 259:4795—4796
 39. Ménagé A, Morel G (1965) Sur la présence d'un acide aminé nouveau dans le tissu de crown gall. *CR Soc Biol Ses Fil* 159:561—562
 40. Ménagé A, Morel G (1966) Sur quelques particularités du métabolisme azoté des tissus de tumeurs d'*Opuntia vulgaris*. *CR Soc Biol* 160:52—54
 41. Ménagé A, Tempé J, Morel G (1966) Analyse des acides aminés par chromatographie. II. Détection automatique des guanidines. *Physiol Veg* 6:317—322
 42. Metzler DE (1977) *Biochemistry, the chemical reactions of living cells*. Academic Press, London New York
 43. Milo GE, Srivastava BIS (1969) RNA-DNA hybridization studies with the crown gall bacteria and tobacco tumour tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 34:196—199
 44. Montoya A, Chilton MD, Gordon MP, Sciaky D, Nester EW (1977) Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumour cells: role of plasmid genes. *J Bacteriol* 129:101—107

45. Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2:617—626
46. Morel G (1956) Métabolisme de l'arginine par les tissus de crown gall de topinambour. *Bull Soc Fr Physiol Veg* 2:76
47. Morel G (1970) Déviations du métabolisme azoté des tissus de crown gall. In: *Les cultures de tissus de plantes*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp 463—471
48. Murai N, Kemp JD (1982) Octopine synthase m-RNA isolated from sunflower crown gall callus is homologous to the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:86—90
49. Petit A, Tempé J (1978) Isolation of *Agrobacterium* Ti-plasmid regulatory mutants. *Mol Gen Genet* 167:147—155
50. Petit A, Delhayc S, Tempé J, Morel G (1970) Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol Veg* 8:205—213
51. Petit A, Dessaux Y, Tempé J (1978a) The biological significance of opines. I. A study of opine catabolism by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Ridé M (ed) *Proc 4th Int Conf Plant Pathog Bact*. INRA, Angers, pp 143—152
52. Petit A, Tempé J, Kerr A, Holsters M, Montagu M, Van, Schell J (1978b), Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmids. *Nature* 271:570—571
53. Petit A, David C, Dahl GA, Ellis JG, Guyon P, Casse-Delbart F, Tempé J (1983) Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet* 190:204—214
54. Quétier F, Huguet T, Guillié E (1969) Induction of crown gall: partial homology between tumourcell DNA, bacterial DNA and the G+C rich DNA of stressed normal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 34:128—133
55. Roberts WP, Tate ME, Kerr A (1977) Agrocin 84 is a 6-N-phosphoroamidate of an adenine nucleotide analogue. *Nature* 265:379—381
56. Schell J (1978) The use of the Ti-plasmid as a vector for the introduction of foreign DNA into plants. In Ridé M (ed) *Proc 4th Int Conf Plant Pathog Bact*. INRA-Angers, pp 115—126
57. Schell J, Montagu M Van, Beuckeleer M De, Block M De, Depicker A, Wilde M De, Engler G, Genetello C, Hernalsteens JP, Holsters M, Seurinck J, Silva B, Vliet F Van, Villaroel R (1979) Interaction and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc R Soc London Ser B* 204:251—266
58. Schilperoort RA, Veldstra H, Warnaar SO, Mulder G, Cohen SA (1967) Formation of complexes between DNA isolated from tobacco crown gall tumours and RNA complementary to *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* 145:523—525
59. Schilperoort RA, Meijs WH, Pippel GMW, Veldstra H (1969) *Agrobacterium tumefaciens* crossreacting antigens in sterile crown gall tumours. *FEBS Lett* 3:173—176
60. Schilperoort RA, Sittert NJ Van, Schell J (1973) The presence of both phage PS8 and *Agrobacterium tumefaciens* A6 DNA base sequences in A6 induced sterile crown gall tissue cultured in vitro *Fur J Biochem* 33:1—7
61. Schroeder J, Schroeder G, Huisman H, Schilperoort RA, Schell J (1981) The m-RNA for lysopine dehydrogenase in plant tumour cells is complementary to a Ti-plasmid fragment *FEBS Lett* 129:166—238
62. Sciaky D, Montoya AL, Chilton MD (1978) Fingerprints of *Agrobacterium* Ti-plasmids. *Plasmid* 1:238—253
63. Seitz EW, Hochster RM (1964) Lysopine in normal and in crown gall tumour tissue of tomato and tobacco. *Can J Bot* 42:999—1004
64. Spano L, Pomponi M, Costantino P, Slogteren GMS Van, Tempé J (1982) Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol* 1:291—300
65. Tate ME, Ellis JG, Kerr A, Tempé J, Murray KE, Shaw KJ (1982) Agropine: a revised structure. *Carbohydr Res* 104:105—120

66. Tempé J, Ménagé A, Morel G (1966) Analyse des acides aminés par chromatographie. III. Adaptation de l'autoanalyser à une double coloration permettant la révélation simultanée des acides aminés et des guanidines. In: Automation in analytical chemistry, vol. 2. Mediad, Ardsley, pp 421—425
67. Tempé J, Estrade C, Petit A (1978) The biological significance of opines. II. The conjugative activity of the Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Ridé M (ed) Proc 4th Int Conf Plant Pathog Bact. INRA-Angers, pp 153—160
68. Tempé J, Guyon P, Tepfer D, Petit A (1979) The role of opines in the ecology of the Ti-plasmids of *Agrobacterium*. In: Timmis KN, Pühler A (eds) Plasmids of medical, environmental, and commercial importance. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, pp 353—363
69. Tempé J, Petit A, Bannerot H (1982) Présence de composés semblables à des opines dans des nodosités de luzerne. CR Acad Sci (Paris) Ser III 295:413—416
70. Tepfer DA, Tempé J (1981) Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*. CR Acad Sci (Paris) Ser III 292:153—156
71. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumours. Cell 19:729—739
72. Wendt-Gallitelli MF, Dobrigkeit I (1973) Investigations implying the invalidity of octopine as a marker for transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Z Naturforsch C Biosci 28C:768—771
73. White FF, Nester EW (1980) Hairy root: Plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacteriol 141:1134—1141
74. White FF, Ghidossi G, Gordon MP, Nester EW (1982) Tumour induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. Proc Natl Acad Sci USA 79:3193—3197
75. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982a) The TL-DNA in octopine crown gall tumours codes for seven well defined polyadenylated transcripts. EMBO J 1:139—146
76. Willmitzer L, Sanchez-Serrano J, Buschfeld E, Schell J (1982b) DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. Mol Gen Genet 186:16—22
77. Zaenen I, Larebeke N Van, Teuchy H, Montagu M Van, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J Mol Biol 86:109—127



**Взаимодействие Rhizobium
с растениями**

4. ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИД RHIZOBIUM MELILOTI И ИХ УЧАСТИЯ В КОНТРОЛЕ ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ И АЗОТФИКСАЦИИ: МЕГАПЛАЗМИДЫ pSym И ДРУГИЕ КРУПНЫЕ ПЛАЗМИДЫ

Г. ЮГЕ*, К. РОЗЕНБЕРГ*, Ф. КАСС-ДЕЛЬБАР**,
Т. ДЕ ЛАЖЮДИ*, Л. ЖУАНЕН**, Ж. БАТЮ*, П. БУАСТАР*,
Ж.-С. ЖЮЛЛИО*** и Ж. ДЕНАРЬЕ*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время симбиоз *Rhizobium* с бобовыми — наиболее эффективная система биологической фиксации атмосферного азота. Основными поставщиками связанного азота служат такие культуры, как люцерна и соя [12]. Штаммы партнера люцерны по симбиозу *Rhizobium meliloti* — это быстрорастущие ризобии, которые на основании нумерической таксономии, симбиотических свойств, данных по гибридизации нуклеиновых кислот и результатов генетических экспериментов составляют однородную группу, явно отличающуюся от группы штаммов *R. leguminosarum*, включающей *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. trifolii* [10, 16].

У всех штаммов быстрорастущих ризобий, изучавшихся до настоящего времени, описаны крупные плазмиды с молекулярной массой более 90 МДа (см. обзор [6]). Установлено, что в группе *R. leguminosarum* плазмиды различных размеров, молекулярная масса которых варьирует в пределах 120—550 МДа, несут гены, контролирующие такие свойства симбиотического характера, как специфичность по отношению к хозяевам и образование клубеньков [2, 13], а также азотфиксацию [17, 20, 22]. Среди этих плазмид не выявлено какого-либо однородного класса по их размеру и не обнаружено взаимосвязи между присутствием генов симбиоза и размером плазмид [17].

В этой статье представлен обзор результатов нашей лаборатории, показывающих, что у *R. meliloti* имеется два класса крупных

* T. Huguet, C. Rosenberg, P. De Lajudie, J. Batut, P. Boistard, J. Dénarié, Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, C.N.R.S.-I.N.R.A., 31320 Castanet-Tolosan, France.

** Present Address: Laboratoire de Biologie Cellulaire, Route de Saint-Cyr, 78000 Versailles, France.

*** Эта статья посвящена памяти нашего друга Ж.-С. Жюллио, трагически погибшего 21 февраля 1982 г.

плазмид, отличающихся по размеру: 1) мегаплазмиды с молекулярной массой 450 МДа, представленные во всех штаммах и несущие гены *nif* и *nod*, и 2) плазмиды с молекулярной массой в пределах от 90 до 250 МДа, которые не несут генов нитрогеназы, проявляют ограниченную гомологию последовательностей ДНК и, по видимому, несут незначительную для эффективного образования клубеньков у *Medicago sativa*.

ДВА КЛАССА ПРИРОДНЫХ ПЛАЗМИД У *R. MELILOTI*

Чтобы обеспечить максимальное генетическое разнообразие среди обследуемых штаммов *R. meliloti*, было отобрано 30 изолятов различного географического происхождения (табл. 4.1), представляющих три разные группы штаммов, индуцирующих образование клубеньков, предложенных Броквеллом и Хили [4] на основании способности индуцировать этот процесс у разных видов *Medicago*, *Melilotus* и *Trigonella*.

С помощью метода щелочной денатурации для экстрагирования ДНК удалось установить наличие крупных плазмид с молекулярной массой в пределах 90—250 МДа во всех штаммах, за исключением четырех: RCR2011, CC2013, S26 и A145 [5, 14, 23]. Число таких рRme-плазмид варьировало от штамма к штамму от 1 до 3 (табл. 4.1). Следует отметить, что лишь два штамма несли плазмиду с молекулярной массой 85 МДа, а очень малых плазмид (молекулярная масса < 10 МДа), пригодных для использования в качестве векторов для клонирования, обнаружено не было.

4.1. Перечень штаммов* *R. meliloti* и состав их плазмид [5, 23]

Географическое происхождение	Кодовый номер
Южная Африка	Rf22(3)**
Северная Америка	12(2), V7(2), S14(2) Balsac (3), 102F51***(2) 102F28(4), S26***(1) S33***(2), 54032(2) I1(3), 3DoA20a(2)
Южная Америка	U45***(2), B294(2) U54(2)
Океания	1322(2), RCR2011***(=SU47)(1) CC169(2), CC2003(2) CC2013(1), CC2090(2) CC2093(2)
Европа	L5-30(2), 41(2) 311(3), A145(1) Sa10(2), Lb1(2) Ls2a(3), Ve8(3)

* Эти штаммы описаны в работах [5, 23].

** Число полос кзк ДНК, наблюдаемых после электрофореза в агарозном геле, указано в скобках согласно данным Розенберга и др. [23].

*** Используется в коммерческих инокулянтах.

Небольшие модификации аналитического метода «лизиса в геле» Экхарда [8], предложенные Банфальви и др. [1], а также Розенбергом и др. [23, 24], позволили выявить в дополнение к уже описанным *rRme*-плазмидам также плазмиды с очень высокой молекулярной массой, превышающей 450 МДа. В каждом штамме содержится по одной такой плазмиде [23, 24]. Мы предложили называть их мегаплазмидами, чтобы отличать от других *rRme*-плазмид.

МЕГАПЛАЗМИДЫ

Локализация структурных генов нитрогеназы

Высокая степень консерватизма у различных азотфиксирующих бактерий последовательностей ДНК, кодирующих структурные гены нитрогеназы [20, 26], позволила локализовать у *Rhizobium* гены *nif* прямыми физическими методами. Рекомбинатные плазмиды, несущие гены *nif*, которые были выделены из *Klebsiella pneumoniae*, использовали в качестве проб для демонстрации того, что по меньшей мере структурные гены нитрогеназы *nifD* и *H* локализованы у штаммов группы *R. leguminosarum* в плазмидах [17, 20, 22].

Была сконструирована рекомбинатная плаزمида *rRmR2*, содержащая по крайней мере часть генов *R. meliloti* 2011 *nifD* и *H* [26, 27]. Эта гибридная плазмида была использована в качестве пробы для физической локализации генов у 18 штаммов *R. meliloti*: A145, S26, L530, 41, V7, U45, 102F51, 12, 1322, Ls2a, Balsac, Ve8, S14, 102F28, Rf22, RCR2011, CC2013 и CC2020. Лизаты, полученные методом «лизиса в геле» [24], были подвергнуты электрофорезу и блоттинг-гибридизации с пробой *rRmR2* (рис. 4.1).

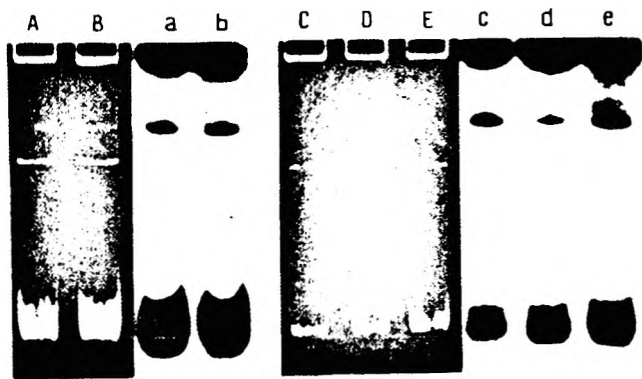


Рис. 4.1. Электрофорез в агарозном геле лизатов штаммов *R. meliloti*: A — 1322; B — 12; C — 102F51; D — L5-30; E — U45. Строчными буквами обозначены соответствующие радиоавтографы блоттинг-гибридизации с *rRmR2* по Саузерну.

Полоса кзк ДНК (ковалентно замкнутая кольцевая ДНК), соответствующая мегаплазмиде каждого из 18 штаммов, давала интенсивную гибридизацию с пробой *nifDH*.

Напротив, гибридизация не наблюдалась с полосами кзк ДНК плазмид *pRme* с меньшей молекулярной массой (90—250 МДа), за исключением штамма V7, плаزمиды которого *pRmV7a* с молекулярной массой 200 МДа гибридизовалась с *pRmR2* [23]. С другой стороны, эта плазмиды не давала гибридизацию с генами *nifDH* *K. pneumoniae* [22]. Поэтому весьма вероятно, что гибридизация плазмиды *pRmV7a* обусловлена последовательностью ДНК, присутствующей в *pRmR2* в дополнение к генам *nifDH*.

Это указывает на локализацию генов *nifD* и *H* у всех изученных штаммов на мегаплазмиде, а не на плазмидах меньшего размера.

Локализация генов *nod*

Независимые спонтанные *Nod*⁻-производные штамма L5-30 были случайно выявлены после хранения при пониженной температуре. О том, что это были производные L5-30, свидетельствовал тот же характер чувствительности клеток к ряду специфических бактериофагов, что и у дикого типа. У всех этих производных сохранились две плазмиды: мегаплазмиды и *pRmeL5-30a* (90 МДа). Рестрикционный анализ не выявил какой-либо делеции в меньшей плазмиде.

Напротив, у всех изученных *Nod*⁻-мутантов гибридизация с областью *K. pneumoniae nifDH* более не прослеживалась [23]. Эти делеции *nif nod* не настолько велики, чтобы их можно было обнаружить по различию в электрофоретической подвижности ковалентно замкнутых кольцевых форм мегаплазмиды. Те же результаты получены и для *Nod*⁻-производных штаммов Lb1 и Sa10.

Банфальви и др. [1] наблюдали одновременную утрату генов *nod* и *nif* у производных штамма 41 с делецией в мегаплазмиде. Аусюбель и др., Душа и др. и Лонг привели в данной книге результаты, свидетельствующие о том, что у штамма RCR2011 гены *nod* также локализованы на мегаплазмиде.

Таким образом, у пяти исследованных до сих пор штаммов (L5-30, 41, Sa10, Lb1 и RCR2011) гены *nod* локализованы на мегаплазмиде.

Тот факт, что спонтанные делеции мегаплазмиды, отобранные по фенотипу *Nod*⁻, приводят к утрате структурных генов нитрогеназы, означает локализацию этих генов *nif* только на мегаплазмиде, но не на хромосоме.

ПЛАЗМИДЫ *pRme*

Было показано, что в группе *R. leguminosarum* некоторые плазмиды с молекулярной массой 90—250 МДа проявляют значительную степень гомологии [21, 22] и контролируют симбиотические

характеристики штаммов [6]. Мы задались целью выяснить, справедливо ли это положение и для плазмид *R. meliloti* pRme, относящихся к классу того же размера.

Исследование гомологии последовательностей ДНК

Изучение степени консерватизма последовательностей плазмид pRme проводили на штаммах различного географического происхождения, у которых имеется лишь одна pRme-плазида: L5-30 (Европа; молекулярная масса pRme 91 МДа), 41 (Европа, 150 МДа), 102F51 (Северная Америка, 100 МДа), 12 (Северная Америка, 107 МДа), V7 (Северная Америка, 197 МДа), 54 (Южная Америка, 153 МДа) и 1322 (Новая Зеландия, 121 МДа). Ковалентно замкнутую кольцевую ДНК выделяли методом щелочной денатурации [14] и подвергали воздействию различных рестриктирующих эндонуклеаз. Рестрикционные характеристики плазмид у перечисленных штаммов заметно различались. Не обнаруживалось ни одной полосы, общей для всех изучавшихся плазмид, вне зависимости от применявшихся рестриктаз, дающих либо большое число фрагментов (*EcoRI*, *HindIII* или *BamHI*), либо малое (*SmaI*, *KpnI* или *XbaI*).

Для более точного определения степени гомологии последовательностей были проведены эксперименты по гибридизации ДНК/ДНК методом Саузерна. Очищенные молекулы pRme, радиоактивно меченные с помощью ник-трансляции, подвергали блоттинг-гибридизации по Саузерну с рестрикционными фрагментами плазмид из других штаммов. Гибридизация обнаруживалась во всех опытах, что указывает на существование некоторого уровня гомологии среди всех изучавшихся плазмид.

Число гибридизующихся полос и интенсивность блоттинг-гибридизации различались в зависимости от пробы ДНК и проверяемой плазмиды

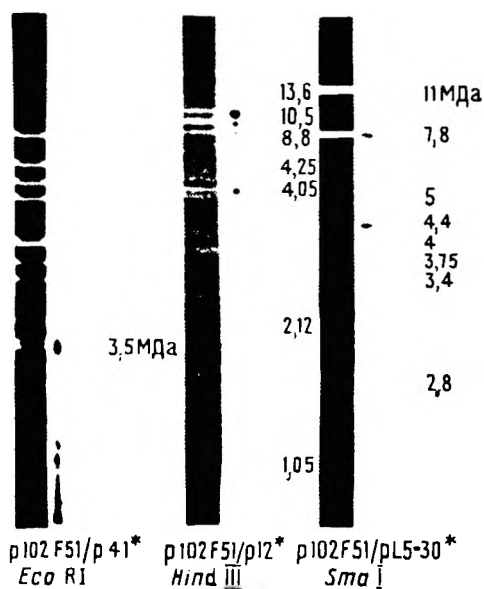


Рис. 4.2. Продукты эндонуклеазной рестрикции были расфракционированы в агарозных гелях, перенесены на нитроцеллюлозные листы и гибридизованы с ³²P-меченной плазмидной ДНК, взятой в качестве пробы [14]:

слева — рестрикционный профиль плазмиды, предназначенной для блоттинг-гибридизации; справа — радиоавтографы после гибридизации плазмидной пробы с продуктами расщепленной ДНК дорожки слева.

(рис. 4.2). Во всех случаях обнаруживалось лишь ограниченное число гибридизующихся рестрикционных фрагментов, что свидетельствовало об ограниченной степени гомологии между плазмидами. В опытах по тепловой денатурации выявилась высокая стабильность молекулярных гибридов, указывающая на небольшую дивергенцию в нуклеотидной последовательности в пределах коротких гибридизующихся отрезков. Какой-либо корреляции между степенью гомологии плазмид *pRme* и географическим происхождением штаммов найдено не было.

Для изучения организации гомологичных последовательностей среди плазмид *pRme* мы построили физическую карту одной из таких плазмид, *pRme41* (150 МДа), изолированной из хорошо изу-

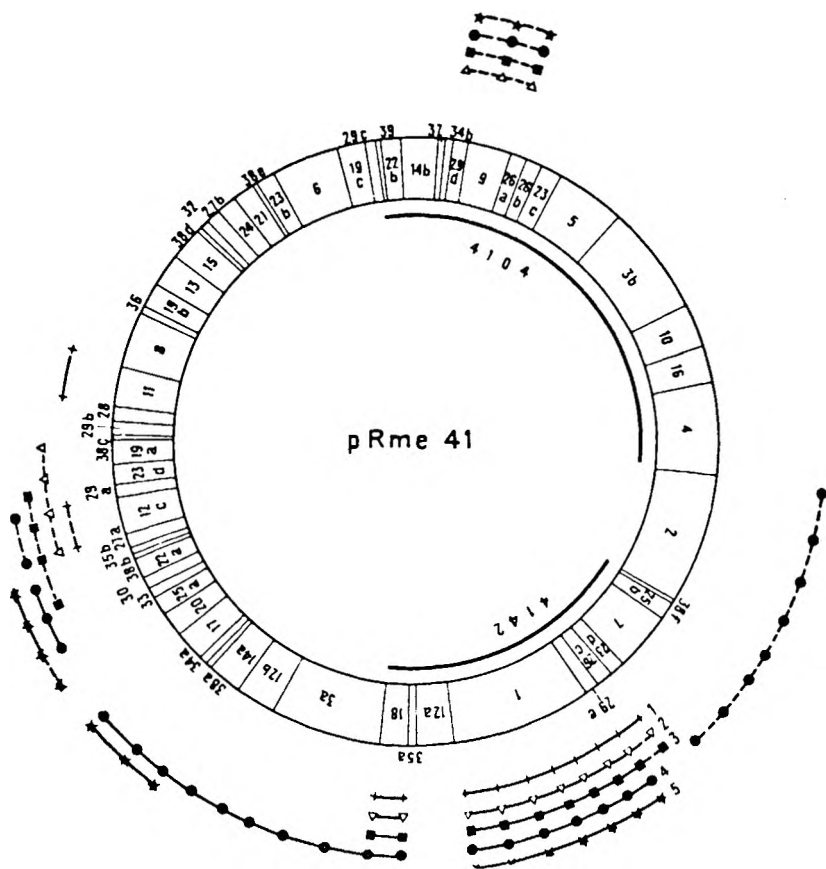


Рис. 4.3. *Hind*III-рестрикционная карта ДНК плазмиды *pRme41* и участки гомологии с ДНК плазмиды *pRme Rhizobium* и *Ti*-плазмиды *Agrobacterium*. Участки слабой гомологии изображены пунктирными линиями, линии и цифры на физической карте относятся к эписомам *pGM14104* и *pGM14142*, использованным в генетическом эксперименте:

1 — *pRmeL5-30*; 2 — *pRme102F51*; 3 — *pRme1322*; 4 — *pTiC58*; 5 — *pTiB6S3*.

ченного штамма 41 [1]. Эта карта построена методом Дениккера и др. [7]: рестрикционные фрагменты, образовавшиеся при неполном расщеплении *pRme41* эндонуклеазой *HindIII*, были клонированы в плазмиде *pBR322* [18]. Для построения карты использованы перекрывающиеся фрагменты. На рисунке 4.3 сведены результаты, касающиеся локализации фрагментов *pRme41*, гомологичных последовательностям из штаммов L5-30, 102F51 и 1322 *Ti*-плазмиды из *A. tumefaciens* C58 (нопалинового типа) и B6S3 (октопинового типа). *pRme*-Пробы гибридизовались главным образом с фрагментами, сосредоточенными в трех участках карты, причем наиболее сильная гибридизация наблюдалась с участком, клонированным в эписоме *pGM14142*. Неожиданно оказалось, что степень гомологии ДНК *pRme41* была значительно более высокой с *Ti*-плазмидами, чем с другими *pRme*-плазмидами. Обе *Ti*-плазмиды, C58 и B6S3, давали интенсивную гибридизацию с областью «4142» (как и другие *pRme*-плазмиды), а также с другими участками, расположенными по часовой стрелке.

Использование клонированных фрагментов *pRme41* в качестве проб позволило показать, что участки *pRme41*, включающие фрагменты *HindIII* с 12 по 17b и с 33 по 35b соответственно, гомологичны консервативным участкам *Ti*-плазмид С и В, участвующим в репликации и переносе ДНК [9, 11]. Область «4142» плазмиды *pRme41* интенсивно гибридизовались с участками *Ti*-плазмид, которые, насколько нам известно, еще не охарактеризованы генетически. Не найдено гомологии, между *pRme41* и Т-ДНК. В отношении гомологии с *Ti*-плазмидами плазмиды *pRme41* не очень значительно отличаются от *Nif*-плазмид группы *R. leguminosarum* [21]. Другими словами, *pRme*-плазмиды *R. meliloti*, по-видимому, проявляют между собой не больше гомологии, чем с другими плазмидами *Rhizobiaceae*.

Генетические исследования

Генетическому изучению была подвергнута плаزمида *pRme41*. Избранный подход заключался в клонировании *pRme41* в составе плазмиды *RP4*, имеющей широкий круг хозяев, и использовании некоторых полученных таким образом *RP4'*-эписом для специфического встраивания транспозонов в *pRme41* и ее мобилизации.

Продукты частичного расщепления *pRme41* под действием *HindIII* клонировали в составе гена *Km* (*HindIII*-сайт) плазмиды *RP4*. Некоторые *RP4'* показаны на рисунке 4.3. Эписома *pGM14104* была введена в штамм *E. coli*, несущий транспозон *Tn5* (*Km^R*) в хромосоме. Гибриды *pGM14104::Tn5* были отобраны путем переноса в другой штамм *E. coli* и введены в реципиентный штамм 41 с помощью конъюгации. Рекомбинация между гомологичным участком *pRme41* и *pGM14104::Tn5* привела к встраиванию *Tn5* в *pRme41* (рис. 4.4). Элиминация *RP4'* в ризобияльных клетках была достигнута путем отбора клонов, устойчивых к двум фагам

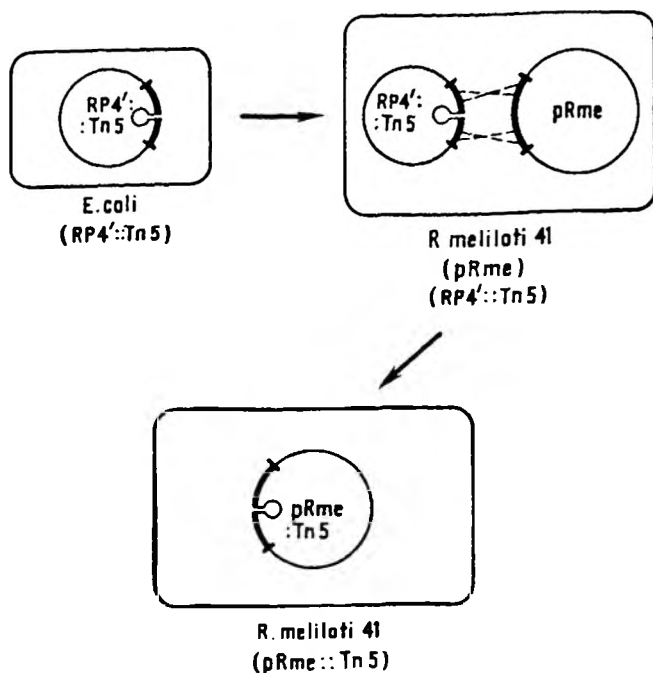


Рис. 4.4. Схема опыта по встраиванию Tn5 в плазмиду pRme41.

(PRR1 и GU5), специфичных к бактериям, несущим RP4. Штамм 41 (pRme41::Tn5) оказался полностью эффективным.

Встраивание Tn5 в плазмиду pRme41 позволило изучить ее перенос. Она была способна к автономной передаче в другой штамм *R. meliloti*, L5-30, с низкой частотой ($\sim 10^{-7}$). Плазмиды pRme L5-30 и pRme41::Tn5 оказались совместимыми. Перенос pRme41::Tn5 в *A. tumefaciens* C58 не был обнаружен; pGM14142, RP4', не имеющая общего фрагмента pRme41 *Hind*III с pGM14104 (см. рис. 4.3), была использована для мобилизации pRme41::Tn5 за счет гомологии ДНК [15]. Штамм 41 (pRme41::Tn5) (pGM14142) мог переносить pRme41::Tn5 в *R. trifolii* LPR5001 и *A. tumefaciens* C58 с частотой порядка 5×10^{-7} (рис. 4.5). Трансконъюганты *R. trifolii* и *A. tumefaciens* pRme41::Tn5⁺ были неспособны к образованию клубеньков на корнях *M. sativa* (Розенберг и др., *готовится к печати*); pRme41::Tn5 была совместима с rTiC58, но не с криптоической большой плазмидой pAtC58 (Розенберг и др., *готовится к печати*). Штамм 41 (pRme::Tn5), как и штамм дикого типа 41, ведет себя, как штамм *A. tumefaciens*, утилизирующий опии: удается выделить его мутанты, способные использовать октопин в качестве единственного источника углерода и азота. Когда pRme41::Tn5 была введена в C58C1, штамм *A. tumefaciens* инопалинового типа, излечившийся от своей Ti-плазмиды, его способность катаболизировать опиины не восстановилась.

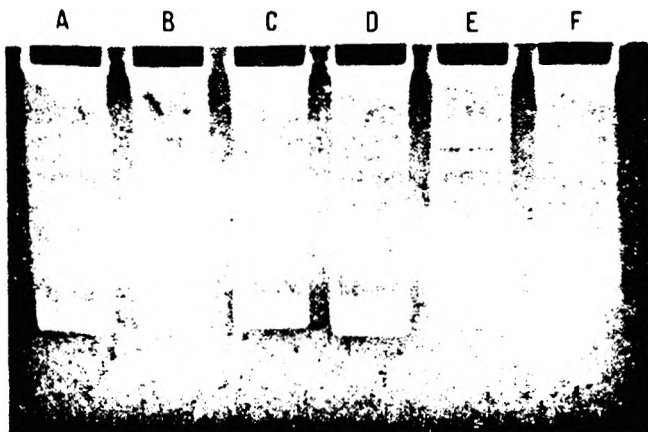


Рис. 4.5. Электрофорез в агарозном геле лизатов штаммов:

A — *R. meliloti* L530 (pRme41::Tn5); B — *R. meliloti* 41 (pRme41::Tn5); C — *R. meliloti* 41-Cal; D — *R. meliloti* 41 (pRme41::Tn5) (pGMI4142); E — *R. trifolii* LPR5001 (pRme41::Tn5) (pGMI4142); F — *A. tumefaciens* C58 (pRme41::Tn5) (pGMI4142).

Попытки излечить штамм 41 от плазмиды pRme41::Tn5 с помощью различных воздействий (теплом, голоданием по фосфору, лаурилсульфатом, акридиновым оранжевым и т. д.) к успеху не привели: обнаружить Km^r-производные не удалось. Как известно, вставка бактериофага Mu в плазмиду RP4 предотвращает репликацию образующегося тандема RP4::Mu в клетках *Rhizobium* [3] и *Agrobacterium* [28]. Удивительно, что вставка Mu в RP4' pGMI4142 (несущую фрагмент pRme41) существенно не снижает частоту ее переноса из *E. coli* в *R. meliloti* 41. Тем не менее присутствие pGMI4142::Mu привело к некоторой нестабильности pRme41::Tn5. Удалось выделить Km^r-производный штамм, излечившийся одновременно от pRme41::Tn5 и pGMI4142::Mu; он назван 41-Cal (рис. 4.5). Чтобы удостовериться, что этот штамм действительно излечен от pRme41, приготовили радиоактивную пробу из очищенной pRme41 и гибридизовали ее с суммарной ДНК штаммов 41 и 41-Cal, расщепленной *Hind*III: для 41-Cal не было обнаружено гибридизационной полосы. Штамм 41-Cal дал начало клонам, утилизирующим октопин так же эффективно, как и дикий тип. Следовательно, опиновый катаболизм не контролируется плазмидой pRme41. Штамм 41-Cal, излечившийся от pRme41, индуцировал у десяти сортов *M. sativa* образование клубеньков и азотфиксацию так же эффективно, как и штамм дикого типа 41 (Розенберг и др., *готовится к печати*). Эти результаты показывают, что pRme41 не несет гены, ответственные за образование клубеньков и фиксацию азота у *M. sativa*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение размеров плазмид и их роли в контроле симбиотических свойств у штаммов группы *R. leguminosarum* дало весьма пеструю картину. Не выявлено определенного класса плазмид по размеру. Показано, что гены *nifDH* локализованы на плазмидах *R. leguminosarum* с молекулярной массой от 130 до 550 МДа [17, 20, 22]. Плазмиды с молекулярной массой в пределах 100—250 МДа несут гены, контролирующие образование клубеньков и специфичность в отношении хозяев у *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* [2] и *R. trifolii* [13].

Напротив, у *R. meliloti* выявлены два класса плазмид, отличающихся по размерам.

1. Мегаплазмиды, для которых мы предлагаем название *pSym* (контроль симбиотических свойств): а) их молекулярная масса превышает 450 МДа; б) они присутствуют во всех эффективных штаммах; в) они несут структурные гены нитрогеназы и во всех изученных до настоящего времени случаях — *nod*-гены.

2. Плазмиды, которые мы предлагаем называть *pRme* (о номенклатуре см. [5]): а) их молекулярная масса варьирует от 90 до порядка 250 МДа; б) их число колеблется от штамма к штамму; в некоторых случаях они могут отсутствовать; а) они не несут структурные гены нитрогеназы.

Возникает важный вопрос: за какие функции ответственны крупные криптические плазмиды *pRme* (в каждой из них имеется более 100 генов)? По-видимому, к ним относятся: 1) функции, связанные с процессом инфекции на бобовых растениях, например специфичность в отношении таких хозяев, которые еще не испытаны, или необязательные функции, такие, как поглощение водорода и т. д.; 2) функции, обеспечивающие жизнедеятельность в ризосфере и 3) жизнедеятельность в почве.

Гены, ответственные за симбиотические взаимоотношения с *M. sativa*, такие, как *nod*, *fix* и *nif*, локализованы на очень крупных плазмидах, несущих более 400 генов. Тот факт, что *nif*-гены не были обнаружены у эффективных штаммов *R. meliloti* на плазмиде меньшего размера, свидетельствует о том, что в *pSym* не может быть утрачено никакого большого сегмента без изменения жизнедеятельности бактерий или симбиотической эффективности и что гены *Rhizobium*, необходимые для эффективного симбиоза с *M. sativa*, многочисленны и сгруппированы на едином репликоне, независимо от хромосомы. Генетическое изучение таких огромных молекул, содержащих гены, контролирующие последовательные стадии установления симбиоза, изучение организации этих генов на мегаплазмиде, их последовательного выражения в процессе формирования клубеньков и фиксации азота требует других генетических средств. В следующей статье будет рассмотрена стратегия генетического изучения мегаплазмиды *R. meliloti* *pSym*.

Благодарности. Данная работа субсидировалась в рамках темы «Биологическая фиксация азота» Национальным обществом

Эльф — Акитен и Горнорудных и химических предприятий. Часть работы выполнена в Лаборатории молекулярной биологии растений (лаборатория, подчиненная Национальному комитету по научным исследованиям) Университета Париж-Юг, Орсэ. Авторы выражают признательность доктору Б. Браутону за просмотр рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Beynon IL, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol* 120:421—429
3. Boucher C, Bergeron B, Barate de Bertalmio M, Dénarié J (1977) Introduction of bacteriophage Mu into *Pseudomonas solanacearum* and *Rhizobium meliloti* using the R factor RP4. *J Gen Microbiol* 98:253—263
4. Brockwell J, Hely FW (1966) Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti*: an appraisal of the systematic treatment of nodulation and nitrogen fixation interactions between hosts and rhizobia of diverse origins. *Aust J Agric Res* 17:885—899
5. Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Dénarié J (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 113:229—242
6. Dénarié J, Boistard P, Casse-Delbart F, Atherly AG, Berry JO, Russell P (1981) Indigenous plasmids of *Rhizobium*. *Int Rev Cytol Suppl* 13:225—245
7. Depicker A, Wilde M De, Devos G, Montagu M Van, Schell J (1980) Molecular cloning of overlapping segments of the nopaline Ti plasmid pTiC58 as a means to restriction endonuclease mapping. *Plasmid* 3:193—211
8. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584—588
9. Engler G, Depicker A, Maenhaut R, Villaroel R, Montagu M Van, Schell J (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol* 152:183—208
10. Gibbins AM, Gregory KF (1972) Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridization. *J Bacteriol* 111:129—141
11. Greve H DE, Decraemer H, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1981) The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6S3. *Plasmid* 6:235—248
12. Hanson CH (1972) Alfalfa science and technology. Am Soc Agron, Madison, USA
13. Hooykaas PJJ, Brussel AAN Van, Dulk-Ras H Den, Slogteren GMS Van, Schilperoort RA (1981) Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291:351—353
14. Jouanin L, Lajudie P De, Bazetoux S, Huguet T (1981) DNA sequences homology in *Rhizobium meliloti* plasmids. *Mol Gen Genet* 182:189—195
15. Julliot JS, Boistard P (1979) Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 173:289—298
16. Kondorosi A, Vincze E, Johnston AWB, Beringer JE (1980) A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Mol Gen Genet* 178:403—408
17. Krol AJM, Hontelez JGJ, Kammen A Van (1982) Only one of the large plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state. *J Gen Microbiol* 128:1839—1847
18. Lajudie P De (1981) Constitution d'une banque de gènes et établissement de

la carte des sites de restriction *Hind* III du plasmide pRme41 de *Rhizobium meliloti*. Thèse Troisième Cycle Université Paris-Sud

19. Long SR, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature* 298:485—488
20. Nuti MP, Lepidi AA, Prakash RK, Schilperoort RA, Cannon FC (1979) Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* 282:533—535
21. Prakash RK, Schilperoort RA (1982) Relationship between Nif plasmids of fast-growing *Rhizobium* species and Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 149:1129—1134
22. Prakash RK, Schilperoort RA, Nuti MP (1981) Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *J Bacteriol* 145:1129—1136
23. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
24. Rosenberg C, Casse-Delbart F, Dusha F, David M, Boucher C (1982) Megaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 150:402—406
25. Rosenberg C, Hugué T (1983) The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction (in preparation)
26. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
27. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes: construction of mutations in symbiotic nitrogen fixation genes of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 289:85—88
28. Vliet F Van, Silva B, Montagu M Van, Schell J (1978) Transfer of RP4::Mu plasmids to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 1:446—455

5. ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИД RHIZOBIUM MELILOTI И ИХ УЧАСТИЯ В КОНТРОЛЕ ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ И ФИКСАЦИИ АЗОТА. МУТАГЕНЕЗ МЕГАПЛАЗМИДЫ pSym С ПОМОЩЬЮ ОБЛАСТЬ-СПЕЦИФИЧНОГО ТРАНСПОЗОНА

И. ДУША*, М. РЕНАЛЬЕ**, Б. ТЕРЗАГИ***,
А. ГАРНЕРОН**, П. БУАСТАР** и Ж.-С. ЖЮЛЛИО**

ВВЕДЕНИЕ

Как показано в предыдущей статье, pSym-мегаплазмида *R. meliloti* несет гены, существенные для симбиотической фиксации азота. Поскольку выражение генов симбиоза в чистой культуре маловероятно, для их изучения лучше всего использовать транспозонный мутагенез. Мутагенез плазмиды pSym с помощью транспозонов затруднен вследствие того, что она неспособна к автономной передаче с заметной частотой. Напротив, возможен транспозонный мутагенез pRL1J1, трансмиссивной плазмиды *R. leguminosarum*, путем опосредованной плазмидой мобилизации транспозона Tn5, первоначально локализованного на хромосоме донорного штамма. В результате появилась возможность выделения мутантов, дефектных по симбиозу [4].

До настоящего времени для транспозонного мутагенеза pSym применялись два метода. Первый из них включает клонирование *in vitro* фрагментов ДНК *R. meliloti*, принадлежащих pSym, транспозонный мутагенез клонированного фрагмента и замену аллеля дикого типа на мутантный. Этот метод был с успехом использован для генетического анализа области *nif* [11], но его трудно применить для генетического анализа всей плазмиды pSym. Второй метод заключается в ненаправленном мутагенезе всего генома *R. meliloti* с помощью такого вектора-самоубийцы, как pJB4J1. Этот метод, в сочетании с тестами на комплементацию и физическим

* I. Dusha, Present Address: Institute of Genetics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, 6701 Szeged, Hungary.

** M. H. Rénalier, A. M. Garnerone, P. Boistard, Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, C.N.R.S.-I.N.R.A., B. P. 12; 31320 Castanet Tolosan, France.

*** B. Terzaghi, Present Address: DSIR Plant Physiology Division, Private Bag, Palmerston North, New Zealand.

** Эта статья посвящена светлой памяти Ж.-С. Жюллио, талантливого молодого ученого и прекрасного товарища, который был инициатором и вдохновителем этих исследований и трагически погиб 21 февраля 1982 г.

картированием, позволил идентифицировать вблизи области *nif* участок *pSym*, контролирующий ранний этап развития симбиоза [9]. Однако маловероятно, что удастся легко провести скрининг комплементирующих клонов для большинства генов, контролирующих симбиоз. Поэтому было бы желательно найти более прямой подход к генетическому анализу *pSym*.

Здесь мы излагаем метод направленного мутагенеза больших участков *pSym*. Кроме того, наш метод, включающий последовательное конструирование *RP4'*, содержащих большие фрагменты из определенных участков *pSym*, облегчает физическое картирование *pSym* и может быть применен для генетических манипуляций с плазмидой в клетках *E. coli*.

КЛОНИРОВАНИЕ КРУПНЫХ ФРАГМЕНТОВ *pSym* В СОСТАВЕ *RP4*

Конструирование коннтеграта *pSym-RP4*

Ранее мы показали, что различные *RP4'*, сконструированные *in vitro* и содержащие разнообразные фрагменты хромосомы *R. meliloti* RCR2011, способны обеспечить ориентированный перенос хромосомы [8]. Это свидетельствует о включении *RP4'* в гомологичный участок хромосомы. Чтобы достичь интеграции *RP4* и *pSym*, мы воспользовались в качестве источника гомологии между этими двумя репликонами *EcoRI*-фрагментом размером 5 т. п. н. (*R3*) области *nif* штамма *R. meliloti* 1021 [11], производного *R. meliloti* RCR2011. Известно, что *nif*-участок *R. meliloti* RCR2011 принадлежит плазмиде *pSym* [10].

Аддитивная законная рекомбинация между двумя репликонами приводит к возникновению двух прямых повторов гомологичного фрагмента на стыках между этими двумя репликонами. Фрагмент *R3 nif* содержит внутренний сайт *HindIII* [11]. Обработка *R3 HindIII* дает два меньших фрагмента размером 1 и 4 т. п. н., которые мы назовем соответственно «альфа» и «бета». Чтобы создать два различных фрагмента на стыках в коннтеграте *RP4'-pSym*, вначале был изменен порядок фрагментов *R3* альфа и бета, как показано на рисунке 5.1. Затем измененный таким путем *HindIII*-фрагмент был встроен в *HindIII*-сайт эписомы *RP4*. Структура этой плазмиды, *pGM1106*, показана на рисунке 5.2.

Затем *pGM1106* была внесена путем конъюгации в *Nif+*-производный штамм *R. meliloti* 1021, содержащий вставку *nif::Tn5# # 20* [11]. После внедрения *Gm^r* плазмиды *pRH1J1*, принадлежащей к той же группе несовместимости, что и *RP4* [2], в этот штамм маркер *Tc^r* плазмиды *RP4* не был элиминирован. В клонах *Gm^r* *Tc^r* с помощью электрофореза в агарозном геле не удалось обнаружить автономную *pGM1106*, поэтому можно предположить, что маркер *Tc^r* плазмиды *RP4* сохранялся благодаря встраиванию *pGM1106* в *pSym*. В качестве контрольного был поставлен тот же

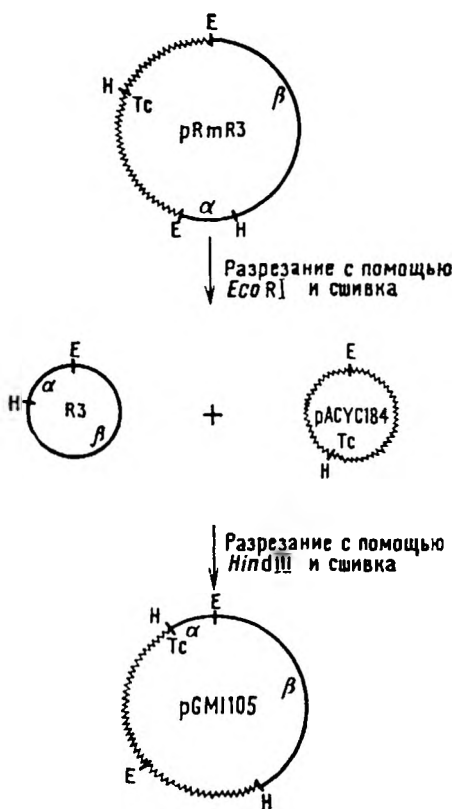


Рис. 5.1. Перестановка альфа- и бета-фрагментов плазмиды R3: pRmR3 [11]. Это гибридная плазмида, содержащая *EcoRI*-фрагмент (R3) размером 5 т. п. н. области *nif* *R. meliloti* 1021, встроенной в *EcoRI*-сайт плазмиды pACYC184 Tc^rCm^r [5].

E, *H* — соответственно сайты эндонуклеазной рестрикции *EcoRI* и *HindIII*.

циклина, но без гентамицина, плазмида pR1111 постепенно утрачивалась, однако в некоторых из таких клонов при анализе методом гель-электрофореза не было обнаружено наличия автономной RP4'-плазмиды, следовательно, исключение RP4' — медленный процесс.

Отбор в клетках *E. coli* коинтеграторов pSum-RP4 с делециями

Один Tc^r-клон, не обнаруживший наличия автономной pGM1106, был взят для конъюгационного эксперимента с дефект-

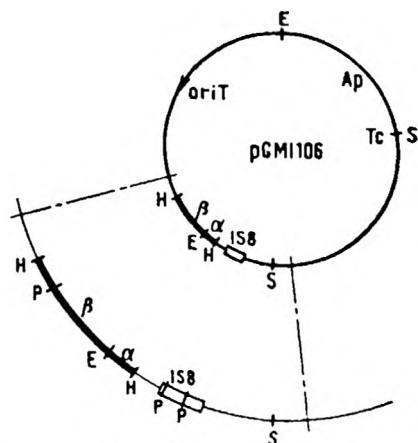
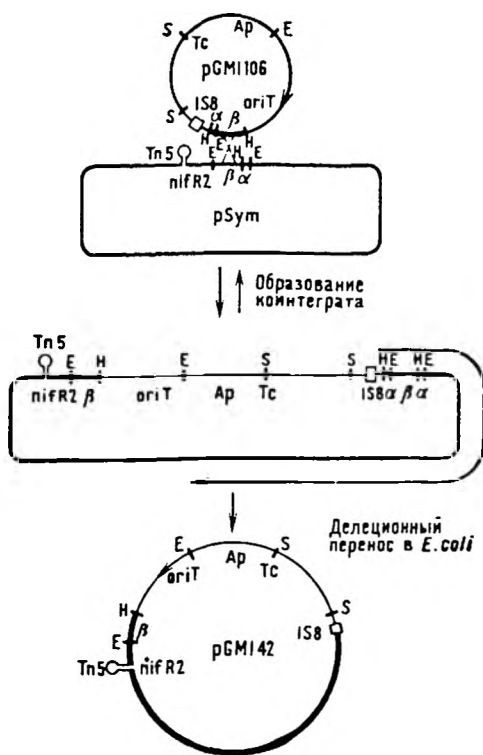


Рис. 5.2. Структура плазмиды pGM1106, RP4', содержащей переставленные альфа- и бета-фрагменты R3 в *HindIII*-сайте RP4:

E, *S*, *P*, *H* — сайты эндонуклеазной рестрикции *EcoRI*, *SalI*, *PstI* и *HindIII* соответственно.

эксперимент с изогенным штаммом, содержащим Km^a-производную RP4, не имеющую гомологии с pSum. На этот раз клоны Gm^r уже не были устойчивы к тетрациклину. Структура гипотетического коинтеграта RP4-pSum показана на рисунке 5.3. Дополнительные доказательства его образования представлены ниже. Когда клоны Gm^r Tc^r выращивали в присутствии тетра-

Рис. 5.3. Предлагаемая модель коинтеграции плазмиды pGM1106 с pSym и образования pGM142. Обозначения сайтов эндонуклеазной рестрикции смотри в подписи к рисунку 5.2.



ным по рестрикции *rec* А-штаммом *E. coli* в качестве реципиента.

Отбирались устойчивые к канамицину транскоъюганты, содержащие Tn5. Гель-электрофорез показал, что такие транскоъюганты несут различные плазмиды, варьирующие по размеру от приблизительно 150 до 300 т. п. н.

Одна из подобных плазмид, pGM142, несущая вставку в 250 т.п.н., была выбрана для дальнейшего изучения.

Физическая характеристика коинтеграта RP4-pSym с делецией

Если pGM142 образовалась в результате делеции из коинтеграта, имеющего структуру, изображенную на рисунке 5.3, то делеция либо локализована между двумя сайтами pSym и не затрагивает RP4-часть коинтеграта, либо начинается от сайта, расположенного внутри RP4-части коинтеграта. Чтобы различить эти две возможности, мы гибридизовали продукты расщепления pGM142 рестриктазами *SalI* и *HindIII* с пробой IS8. Фрагмент *SalI-HindIII* размером 4,5 т.п.н. в пределах pGM1106, который гибридизуется с IS8, был заменен на фрагмент 6 т.п.н. Это показало, что *HindIII*-сайт RP4, находившийся на стыке с альфа-фрагментом в pGM1106, был элиминирован (Жюллио и др., *готовится к печати*). Далее гибридизация между продуктами расщепления pGM142 рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и пробой R3 показала, что бета-фрагмент остался в pGM142 неизменным, а альфа-фрагмент отсутствовал.

Поэтому начальная точка делеции, приведшей к возникновению pGM142, лежит в пределах RP4. Результаты обеих гибридизаций вполне совместимы с нашей моделью образования коинтеграта между pSym и pGM1106.

На основании результатов проведенных экспериментов можно заключить, что рGM142 возникла в результате делеции в коинтегра-те рGM1106-pSym и что клонированный фрагмент, скорее всего, является частью pSym. Результаты дальнейших опытов по гибридизации показали, что внутренний *Pst*I-фрагмент элемента IS8 [7], представленный на рисунке 5.2, присутствует в рGM142. Поэтому начальная точка делеции находится в сегменте I т.п.н., включающем один конец IS8 и *Hind*III-сайт RP4. По всей вероятности, делеция была вызвана присутствием элемента IS8.

рGM142 содержит гены, контролирующие образование клубеньков

Область плазмиды pSym, контролирующая образование клубеньков, была идентифицирована и локализована в 25 т.п.н. от области *nif* *R. meliloti* 1027 и *R. meliloti* 1126 — двух мутантов, дефектных по образованию клубеньков, у которых затронута данная область pSym [9]. рGM142 может восстанавливать их способность к образованию клубеньков, что полностью согласуется с предложенной структурой. рGM142 была введена в C58C1-штамм *Agrobacterium tumefaciens*, излеченный от его Ti-плазмиды. При использовании полученных трансконъюгантов для инокуляции *M. sativa* в некоторых случаях наблюдались деформации корней, дающие начало клубеньковоподобным структурам. Следовательно, рGM142 несет гены, необходимые для специфического узнавания растения-хозяина на первых этапах процесса инфекции и для индукции морфогенеза клубеньков (Трюше и др., *готовится к печати*).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ рGM142 ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ ТРАНСПОЗОНОВ В pSym

ВСТАВКА Mu В ПЛАЗМИДУ рGM142

Было показано, что бактериофаг Mu предотвращает поддержание плазмид Inc-P1 в клетках *Rhizobium* [3]. Это его свойство было использовано для внедрения транспозона Tn5 в геном *Rhizobium* [2]. Мы сконструировали производную рGM142, в которой профаг Mu был вставлен в ген *tet* RP4-компонента рGM142, как показано на рисунке 5.4. Эта новая производная рGM1104 была использована в качестве вектора-самоубийцы для внедрения транспозона Tn7 в гомологичную часть pSym, как изображено на рисунке 5.5. Перенос Tn7 был осуществлен с помощью рGM1104 из штамма *E. coli*, в котором он был локализован в хромосоме, в реципиентный штамм *E. coli* C600. Затем индивидуальные трансконъюганты, содержащие независимо полученные плазмиды рGM1104::Tn7, скрещивали с *R. meliloti* RCR2011 и вели отбор по признаку приобретения транспозона. Большинство плазмид рGM1104::Tn7 обладали способностью осуществлять перенос Tn7 с высокой частотой. Напротив, рGM1103::Tn7 (см. рис. 5.4), не имеющие участ-

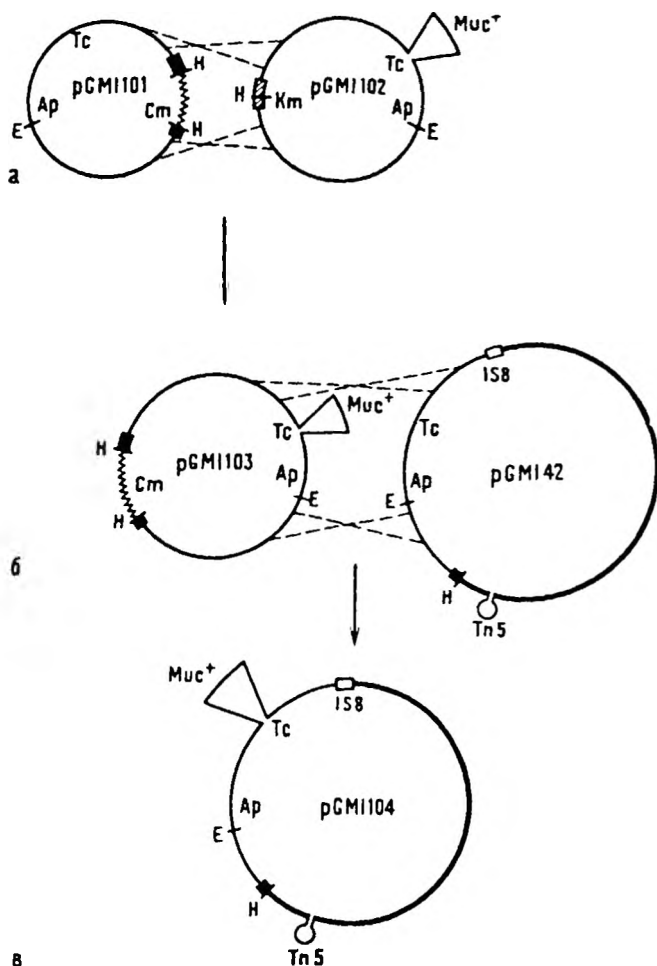


Рис. 5.4. а—в. Конструирование вектора-самоубийцы pGM1104:

pGM1102 — Tc^s-производная RP4, полученная путем вставки профага Muc⁻ в ген *tet* RP4; pGM1101 — Km^s Cm^r-производная RP4, полученная путем вставки плазмиды pACYC184 [5] в *Hind*III-сайт RP4; а — pGM1102 имеет фенотип Km^s Cm^r; б и в — бактериофаг Mu вставлен в ген *tet* pGM142; E, H — сайты эндонуклеазной рестрикции *Eco*R1 и *Hind*III соответственно. Во всех скрещиваниях использованы штаммы *E. coli*, лизогенные по термочувствительному мутанту Mu *cts* 62, что дало возможность отбирать клоны, несущие фаг Muc⁻, который вставлен в ген *tet* путем выращивания при 42 °С.

ков, гомологичных с pSum, переносили Tn7 с частотой, на несколько порядков меньшей. Это отчетливо свидетельствовало о том, что Tn7 был приобретен за счет замены генов, а не путем случайной транспозиции. Редко встречающиеся клоны *E. coli* (pGM1104::Tn7), составляющие 10% от всех клонов, которые не передавали

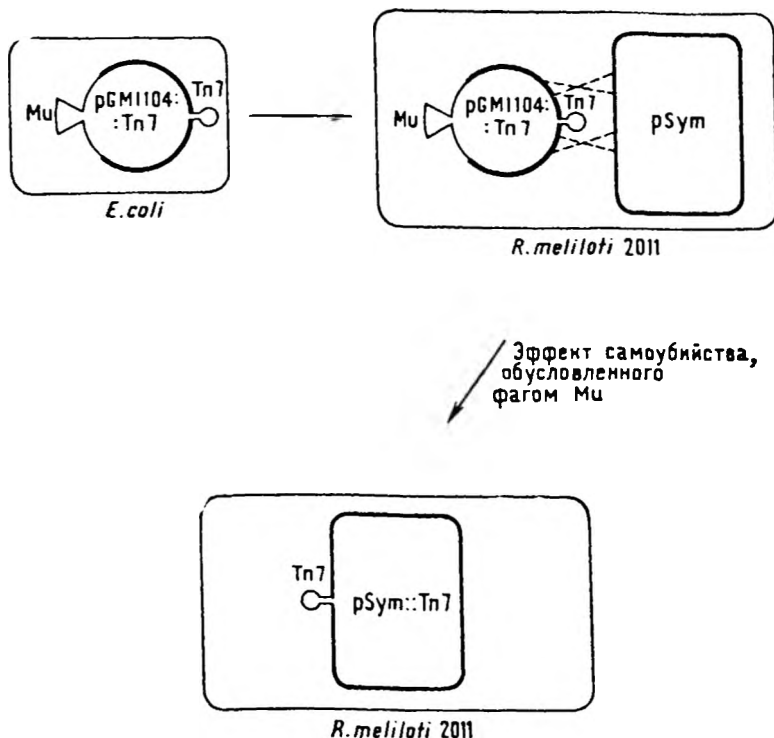


Рис. 5.5. Использование вектора-самоубийцы $pGM1104$ для внедрения транспозона $Tn7$ в область плазмиды $pSym$, гомологичную вставке $pGM142$.

$Tn7$ реципиенту *R. meliloti*, вероятнее всего, содержали транспозон в $RP4$ -части гибридной плазмиды. Интересно отметить, что вставку транспозона в *R. leguminosarum* с помощью вектора-самоубийцы $RP4::Mu::Tn7$ обнаружить не удалось [2].

ВЫДЕЛЕНИЕ МУТАНТОВ, ДЕФЕКТНЫХ ПО СИМБИОЗУ

В предварительном опыте, в котором 683 бактериальных клон, получивших транспозон $Tn7$, испытывались по их симбиотическим свойствам на проростках *M. sativa*, было выявлено 12 мутантов по симбиозу: 3 Nod^- и 9 Fix^- .

Последние распались по меньшей мере на 4 группы с разными фенотипами в отношении внешнего вида клубеньков и инфицированной корневой системы: а) с немногочисленными желтоватыми клубеньками неопределенной формы и аномальными желтоватыми корнями; б) с многочисленными белыми небольшими клубеньками сферической формы; в) с немногочисленными белыми клу-

беньками нормальной формы; г) с немногочисленными бледно-розовыми клубеньками нормальной формы. Следует отметить, что растения, инфицированные мутантами последней группы, восстанавливали ацетилен с низкой, но достоверно фиксируемой скоростью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы описали стратегию генетического анализа мегаплазмид рS_{ym}, включающего сочетание: 1) техники клонирования очень крупных фрагментов рS_{ym} в составе RP4 и 2) использование эффекта самоубийства, обусловленного бактериофагом Mu, для проведения направленного мутагенеза в пределах рS_{ym}.

Фрагментация мегаплазмиды

Одно из преимуществ рассмотренного метода состоит в том, что можно выбирать начало и ориентацию клонируемого фрагмента. Поэтому при одной и той же начальной точке фрагмента на рS_{ym} возможно клонирование в двух направлениях. Другое преимущество заключается в том, что, поскольку делеция, породившая крупную RP4' из контеграта RP4-рS_{ym}, начинается в точке, расположенной в пределах RP4 (см. рис. 5.3), геном RP4 не прерывает клонируемый фрагмент.

Таким образом, часть фрагмента, расположенная дистально относительно выбранного начала клонирования, может быть легко идентифицирована в качестве нового начала для дальнейшего последовательного клонирования. Третье преимущество применяемых методов в том, что, хотя клонируемый фрагмент примерно в 10 раз больше фрагментов, клонируемых с помощью космид, итоговая плаزمида еще поддается изучению обычными методами, используемыми для определения физических свойств плазмид. Физическое картирование фрагмента рS_{ym} размером 250 т. п. н., клонированного в составе рGM142, приближается к завершению (Юге и др., *готовится к печати*).

Генетические исследования

Наконец, наш метод представляет эффективное средство для мутагенеза рS_{ym} и для описания мутаций. Сконструированный контеграт RP4':Mu позволяет эффективно внедрять Tn7 в гомологичную часть рS_{ym}. Благодаря сравнительной простоте физической карты клонированного фрагмента (50 HindIII-фрагментов в случае рGM142) будет нетрудно определить локализацию Tn7 в различных контегратах RP4':Mu. В целом клонирование больших фрагментов рS_{ym} в составе RP4 должно облегчить генетические манипуляции рS_{ym} в хорошо изученной системе *E. coli*.

Благодарности. Работа финансировалась INSERM (в рамках темы «Генетическая рекомбинация»), а также по контракту с

Национальным институтом сельскохозяйственных исследований, Институтом Пастера и др. в рамках темы «Биологическая фиксация азота». Мы признательны Ф. Аусубелю за предоставление различных штаммов и сообщение результатов исследований до публикации, А. Пюлеру за плазмиду RP4 Tc::Mu (=pGM1102) и К. Цишеку за плазмиду pGM11001. Мы выражаем благодарность Ж. Денардьё за постоянный интерес к нашей работе и плодотворные дискуссии и У. Браутону за просмотр рукописи и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barth PT, Datta N, Hedges RW, Grinter NJ (1976) Transposition of a deoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim resistance and streptomycin resistance from R433 to other replicons. *J Bacteriol* 125:800—810
2. Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB (1978) Transfer of the drugresistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* 276:633—634
3. Boucher C, Bergeron B, Barate de Bertalmio M, Dénarié J (1977) Introduction of bacteriophage Mu into *Pseudomonas solanacearum* and *Rhizobium meliloti* using the R factor RP4. *J Gen Microbiol* 98:253—263
4. Buchanan-Wollaston AV, Beringer JE, Brewin NJ, Hirsch PR, Johnston AWB (1980) Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Mol Gen Genet* 178:185—190
5. Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134:1141—1156
6. Datta N, Hedges RW, Shaw EJ, Sykes RB, Richmond MH (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 108:1244—1249
7. Depicker A, Block M De, Inzé D, Montagu M Van, Schell J (1980) IS-like element IS8 in RP4 plasmid and its involvement in coinfection. *Gene* 10:329—338
8. Julliot JS, Boistard P (1979) Use of RP4-primed plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 173:289—298
9. Long SR, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature* 298:485—488
10. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
11. Ruvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559

6. АНАЛИЗ ГЕНОВ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ АЗОТА, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МЕГАПЛАЗМИДЕ RHIZOBIUM MELILOTI

А. КОНДРОШИ * **, Э. КОНДРОШИ **, З. БАНФАЛЬВИ *,
У. БРАУТОН **, К. ПЭНКХЕРСТ **, Г. РАНДХАВА *,
К.-Х. ВОНГ ** и ДЖ. ШЕЛЛ **

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный вид *Rhizobium meliloti* восстанавливает молекулярный азот при симбиотической ассоциации с люцерной (*Medicago sativa*). Установление такого симбиоза для фиксации N_2 протекает в несколько этапов, предположительно контролируемых большим числом генов. Мы изучаем те гены симбиоза, которые находятся в бактерии.

Недавно с помощью мутагенеза нитрозогуанидином и транспозоном Tn5 были выделены мутанты штамма дикого типа *R. meliloti* (AK631), дефектные по симбиозу (Nod⁻ и Fix⁻). Генетическое картирование этих мутаций показало, что некоторые гены *fix* располагаются на бактериальной хромосоме. Однако большинство генов *fix* и *nod* имеет внехромосомную локализацию [4].

Ранее мы сообщили [1], что *R. meliloti* 41 содержит по крайней мере две природные плазмиды pRme41a и pRme41b. Есть данные, позволяющие предполагать, что в pRme41b (мегаплазмида) закодированы некоторые гены образования клубеньков (*nod*) и фиксации азота (*fix*) [1, 15]. Например, показано, что мутанты Nod⁻, выделенные после роста штамма дикого типа AK631 при повышенных температурах, несли делеции в этой плазмиде. Наличие структурных генов для фермента нитрогеназы на pRme41b продемонстрировано гибридизацией клонированного фрагмента ДНК *R. meliloti*, несущего часть структурных генов *nif* [1], с pRme41b. Более того, было показано, что у индуцированных транспозоном Tn5 мутантов по симбиозу, у которых Tn5 не локализуется на карте сцепления *R. meliloti* [8, 9, 20], проба ДНК Tn5 специфически гибридизуется с pRme41b [4]. Структурные гены *nif* были проанализированы более детально. Определена нуклеотидная последовательность гена *nifH* и частично *nifD*, из которой выведена аминокис-

* A. Kondorosi, Z. Banfalvi, G. S. Randhawa, Biological Research Centre, Hung. Acad. Sci., P.O.B. 521, 6701 Szeged, Hungary.

** A. Kondorosi, E. Kondorosi, W. J. Broughton, C. E. Pankhurst, C.-H. Wong, J. Schell, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 5000 Köln 30, BRD.

лотная последовательность нитрогеназы (молекулярная масса 32740 Да) [18]. При экспрессии гена *nifH* в мини-клетках *E. coli* под контролем эффективного промотора *E. coli* был обнаружен белок примерно того же размера (Сваб и Кондорози, *неопубликованные данные*).

В настоящей работе мы приводим данные, свидетельствующие о том, что *pRme41b* несет все гены, необходимые для формирования клубеньков, и что гены *nod* локализируются вблизи *nif* и других генов *fix*. Эти выводы подтверждаются опытами четырех типов: 1) мобилизацией переноса *pRme41b* в другие виды бактерий и изучением симбиотических свойств трансконъюгантов; 2) выделением и анализом R'-плазмид, несущих область *nod* — *nif*; 3) клонированием и физическим картированием сегмента ДНК *nod* — *nif*; 4) изучением транскрипции этой области.

МОБИЛИЗАЦИЯ МЕГАПЛАЗМИДЫ, НЕСУЩЕЙ ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ И ФИКСАЦИЮ АЗОТА, В ДРУГИЕ RHIZOBIA И AGROBACTERIUM

Обнаружилось, что *pRme41b* обладает очень низкой способностью к автономному переносу. Для повышения частоты переноса ей была придана восприимчивость к мобилизации плазмидой типа P-1 *pJB3J1* (предоставленной Дж. Беринджером) путем вставки в нее области мобилизации (*mob*) от RP4.

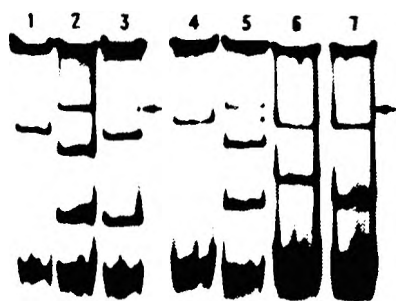


Рис. 6.1. Выявление плазмид у *R. meliloti*, *Rhizobium* sp. и их трансконъюгантов:

дорожка 1 — *Rhizobium* sp., штамм PN4003; дорожки 2 и 5 — АК631, содержащий *pRme41b* :: *pAK11* и *pJB3J1*; дорожка 3 — PN4003, содержащий *pJB3J1* и *pRme41b* :: *pAK11* (стрелка); дорожка 4 — *Rhizobium* sp., штамм МР1К3030; *pJB3J1* :: *pAK11*; дорожка 7 — МР1К8030; дорожка 6 — МР1К3030, содержащий содержащий *pJB3J1* и *pRme41b* :: *pAK11* (стрелка).

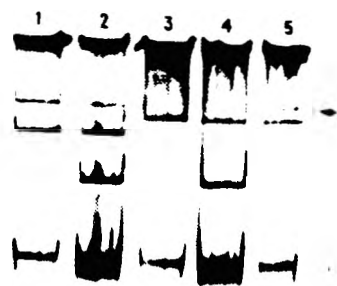


Рис. 6.2. Выявление плазмид у *R. meliloti*, *A. tumefaciens* и их трансконъюгантов. Готовили неочищенные лизаты и проводили гель-электрофорез в соответствии с модифицированной [1] методикой Экхарда [3]:

дорожка 1 — АК631 (верхняя полоса) *pRme41b*, (нижняя полоса) *pRme41a*; дорожка 2 — АК631 (*pRme41b* :: *pAK11*), содержащий *pJB3J1*; дорожка 3 — *A. tumefaciens* CV3101; дорожка 4 — GV3101, содержащий *pJB3J1* и *pRme41b* :: *pAK11*; дорожка 5 — GV3101, содержащий только *pRme41b* :: *pAK11*; стрелка — полоса крупной плазмиды, которой на дорожках 1 и 2 является *pRme41b* и на дорожках 4 и 5 — *pRme41b* :: *pAK11*.

Вначале область *mob* совместно с маркером устойчивости к канамицину (из рекомбинантного клона p1011, любезно предоставленного Р. Симоном) была встроена *in vitro* во фрагмент pRme41b, клонированный в составе pBR322. Затем образованные таким путем рекомбинантные плазмиды (pAK11 и pAK12) были мобилизованы в *R. meliloti*. Поскольку эти рекомбинантные плазмиды не способны реплицироваться в клетках *R. meliloti*, отбор устойчивых к канамицину производных плазмид позволил выделить коинтеграторы pRme41b::pAK11 и pRme41b::pAK12. Было показано, что у большинства рекомбинантов pAK11 или pAK12 встроены в гомологичный фрагмент плазмиды pRme41b.

Коинтеграторы pRme41b были перенесены в делеционные мутанты *nod* — *nif* *R. meliloti* 41, в которых, как оказалось, можно восстановить оба фенотипа *Nod*⁺ и *Fix*⁺. Эти коинтеграторы перенесены также в два других штамма *Rhizobium* (*Rhizobium* sp PN4003 [14] и МРК3030=NGR234 [19]) (рис. 6.1) и в *Agrobacterium tumefaciens* (рис. 6.2). Штаммы *Rhizobium* и *A. tumefaciens*, несущие pRme41b, индуцировали образование клубеньков различного размера на корнях *M. sativa*. Это свидетельствует о том, что по меньшей мере ранние стадии образования клубеньков у *M. sativa* детерминируются плазмидой pRme41b и экспрессируются в этих бак-



Рис. 6.3. а—г. Электронные микрофотографии клубеньков, индуцированных штаммом *A. tumefaciens*, несущим pRme41b:

а — электронная микрофотография самых наружных клеток неэффективного клубенька, показывающая присутствие бактерий в межклеточном пространстве. Увеличение $\times 6000$; б — электронная микрофотография среза клетки корневого волоска, показывающая возможное начало инфекционной нити. Увеличение $\times 2400$; в — электронная микрофотография развивающихся клеток из неэффективного клубенька, показывающая многочисленные проламеллы, содержащие зерна крахмала. Увеличение $\times 6000$; г — электронная микрофотография старых клеток из неэффективного клубенька, показывающая пластиды с крупными зёрнами крахмала и наличие множества митохондрий. Увеличение $\times 6000$.

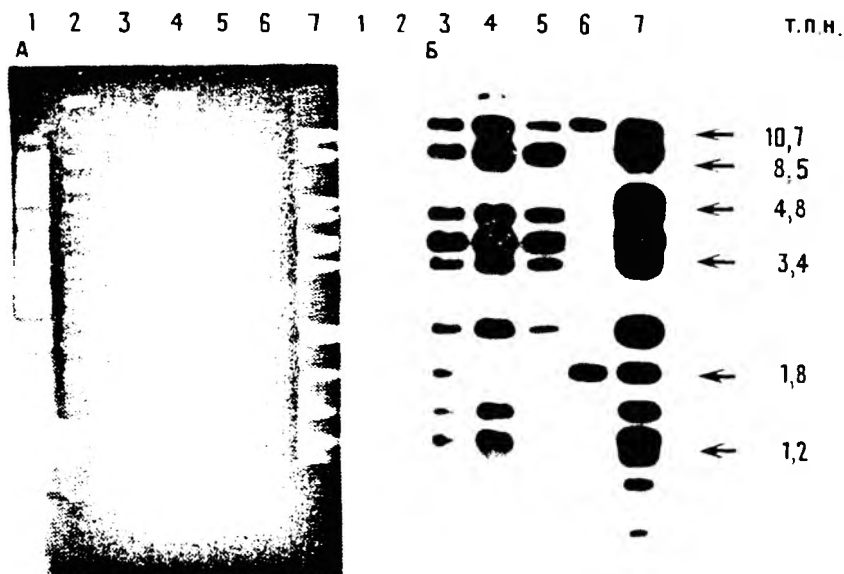


Рис. 6.4. А—Б. Гибридизация области *nif* *R. meliloti* с очищенными R'. *Eco*RI-рестрикционные профили (А) и гибридизационные профили (Б) различных ДНК, для которых в качестве гибридизационной пробы использовали рЕК5022: дорожка 1 — ДНК/рАК13; дорожка 2 — рGR4; дорожка 3 — рGR2; дорожка 4 — рGR1; дорожка 5 — рZb1; дорожка 6 — рGR3; дорожка 7 — рЕК5022.

тернях. Такие клубеньки развивались лишь до определенной стадии (рис. 6.3). Бактерии были обнаружены среди корневых волосков и в межклеточных пространствах наружных слоев клеток. Были выявлены признаки, указывающие на инициацию инфекционной нити. Внутри клеток развивающихся клубеньков не были обнаружены бактерии, но были видны многочисленные пропластиды. В этих клетках происходило обильное отложение крахмала. Хотя гибридизация с космидным клоном, несущим сегмент 49 т. п. н. от рRme41b с блоком генов *nif* (рЕК5022) [10] (рис. 6.4) показала, что трансконъюганты содержали область *nif*, клубеньки не связывали N₂ [11].

Перенос рRme41b позволил выявить на данной плазмиде и другие гены. Таким путем было показано, что способность к утилизации октопина у *R. meliloti* закодирована в рRme41b.

КОНСТРУИРОВАНИЕ R'-ПЛАЗМИД, НЕСУЩИХ ГЕНЫ СИМБИОЗА *R. MELILOTI*

Результаты предыдущих исследований генов симбиоза *R. meliloti* указывали на то, что некоторые из них сгруппированы [1, 2,

15, 17]. Мы сочли, что конъюгативные R'-плазмиды, несущие набор генов симбиоза, могут быть полезны для дальнейших исследований. В литературе сообщалось о сконструированных *in vivo* R', несущих участки хромосомы *R. meliloti* [6, 7, 9]. В данных работах использовалась способность плазмиды R68.45 взаимодействовать с хромосомой. Однако гены симбиоза на этих R' не были идентифицированы.

В наших опытах рJB3J1-производные были получены из штаммов, содержащих Tп5-индуцированные мутации по симбиозу. Поскольку Tп5 не способен перемещаться в новые сайты в клетках *R. meliloti* [4, 13], перенос устойчивости к канамицину в клетки *E. coli* обеспечивает простой и эффективный способ выделения R'-плазмид.

Такие R' появлялись как из хромосомы, так и из мегаплазмиды с частотой 10^{-7} /реципиент. Размер вставки в разных изолятах был неодинаков (вплоть до 200—250 т. п. н.). Было показано, что встроенные участки идентичны тем сегментам ДНК, в которых Tп5 был локализован в соответствующем родительском штамме.

Показано, что некоторые R' из мегаплазмиды гибридизуются с клонированной областью *nif* (рис. 6.4). При переносе R'-плазмид в различные делеционные мутанты *Nod*⁻, во всех случаях восстанавливался фенотип *Nod*⁺. Плазмиды были внесены также в клетки *A. tumefaciens*; полученные трансконъюганты формировали небольшие клубеньки на *M. sativa*. Размер самой малой R' такого типа был равен 128 т. п. н. Из данных физического анализа встроенного участка (см. ниже) мы заключили, что гены мегаплазмиды, контролирующие образование клубеньков и азотфиксацию, сгруппированы на сегменте ДНК размером менее 70 т. п. н.

КЛОНИРОВАНИЕ И ФИЗИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ОБЛАСТИ *NOD—NIF*

С помощью космидного вектора рJB8 создана библиотека генов *R. meliloti*, состоящая из 860 клонов [5]. Для картирования рRme41b методом гибридизации колоний была выделена рекомбинантная космида, несущая структурные гены *nif* (рЕК5022) [10]. В качестве пробы использован *nif*-фрагмент размером 48 т. п. н. [1]. Затем были идентифицированы рекомбинантные космиды, перекрывающие рЕК5022. Для этого в качестве проб для гибридизации воспользовались рЕК5022 и R'*nod-nif*-плазмидой рGR1.

Путем определения сайтов расщепления четырьмя рестриктирующими эндонуклеазами (*Eco*RI, *Kpn*I, *Bst*EII и *Xba*I) на таких космидных молекулах ДНК (рис. 6.5) построена физическая карта сегмента рRme41b размером 140 т. п. н., включающего область *nod — nif*.

Эти космидные клоны оказались полезными для установления размеров делеций у некоторых изолированных ранее *Nod*⁻-мутантов с делециями [1]. Все изученные делеции имели начальную точку на участке, клонированном в рЕК3089, но их длины были различными. Например, у двух мутантов делеции заканчивались в

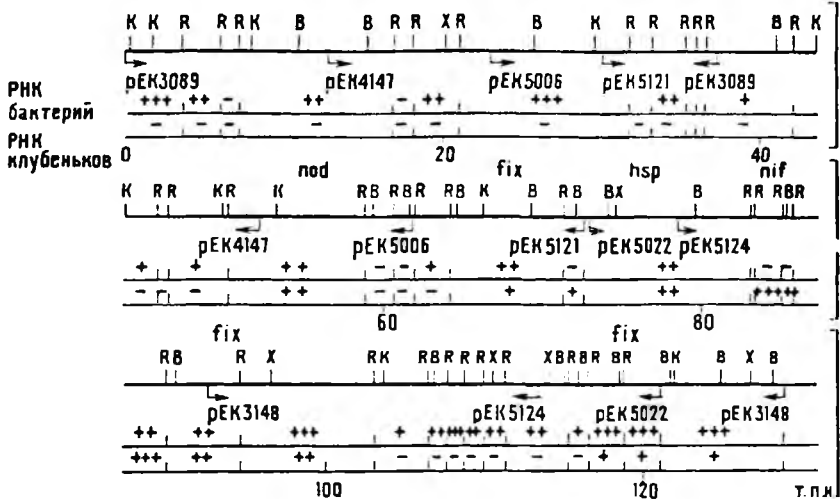


Рис. 6.5. Физическая карта области *nod-nif* *R. meliloti* 41 и транскрипция *EcoRI*-фрагментов в вегетативно растущих бактериях и в клубеньках. Карта построена путем определения сайтов расщепления ДНК эндонуклеазами *EcoRI* (R), *KpnI* (K), *BstEII* (B) и *XbaI* (X). Протяженность вставок в различных космидах указана стрелками. Для выявления транскрибируемых участков из вегетативно выращенных бактерий и из азотфиксирующих клубеньков выделяли РНК, концы метили с помощью ^{32}P и гибридизовали с рекомбинантными молекулами ДНК, расщепленными эндонуклеазой *EcoRI*:

+++ — очень сильная гибридизация; — — гибридизация отсутствует.

«левом» конце pEK5022, а у трех других — в «правом» дистальном *EcoRI*-фрагменте pEK3048. У нескольких мутантов конечная точка делеции выходила за пределы картируемого участка. Как уже сообщалось [1], некоторые *Nod*⁻-мутации *R. meliloti* супрессируются при внесении в клетки pJB5JI, *Sym*-плазмиды *R. leguminosarum*. У некоторых *Nod*⁻-мутантов с делециями способность индуцировать клубеньки у люцерны восстанавливалась *Sym*-плазмидой, но такие клубеньки не связывали азот. У одного из мутантов с делецией трансконъюганты оставались *Nod*⁻, но область *nif* присутствовала. Эти данные комплементационного анализа наряду с картами делеций позволили нам установить порядок расположения генов: *nod-fix-nod-nif*. Результаты опытов по направленному мутагенезу у двух других штаммов *R. meliloti* [2, 16, 17] указывают на наличие многочисленных *fix*-генов вблизи структурных *nif*-генов. Кроме того, картированы две *Nod*⁻-мутации, отстоящие на 30 т. п. н. от структурных *nif*-генов [12]. Сопоставление *EcoRI*-сайтов, установленных в этом участке, с картой pRme41b указывает на высокую степень гомологии между двумя указанными штаммами, хотя некоторые участки, по-видимому, довольно сильно различаются. Исходя из приведенных выше данных и того факта, что pGR3, которая несет участок *nod*, простирающийся до *nifH* (рис.

6.3), еще кодирует специфичность хозяина в отношении образования клубеньков, можно предположить, что вторая область *nod* содержит гены, контролирующие специфичность растения-хозяина (*hsp*).

ВЫРАЖЕНИЕ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА СИМБИОЗ

По нашим наблюдениям лишь сравнительно небольшой участок мегаплазмиды активно транскрибируется в азотфиксирующих клубеньках.

Из клубеньков и из вегетативно растущих бактерий выделяли РНК, метили ^{32}P и гибридизовали с различными R' или космидными клонами.

На рисунке 6.5 показано, что при использовании РНК из вегетативно растущих бактерий наблюдались многочисленные гибридизующиеся фрагменты, даже в случае космидного *nif*-клона. Однако структурные *nif*-гены, как и ожидалось, не экспрессировались. Если гибридизовали РНК из клубеньков, структурные *nif*-гены давали очень сильный сигнал гибридизации (рис. 6.6), что указывает на высокий уровень транскрипции этих генов. Сходные результаты были получены Корбином и др. [2]. Более того, гибридизовался участок размером около 20 т. п. н., локализованный поблизости от структурных *nif*-генов, что также наводит на мысль, что на данном участке ДНК находится несколько генов *fix* (вероятно, *nif*).

Рекомбиантные космиды, представленные на рисунке 6.4, также были испытаны на гибридизацию РНК/ДНК. На рисунке 6.5 показано, что почти каждый фрагмент ДНК гибридизовался с РНК из вегетативных бактериальных клеток, но с РНК из клубеньков гибридизовались лишь участки *nif* и еще два других участка (вероятно, несущие *fix*-гены).

R' , несущие другие участки мегаплазмиды, почти не гибридизовались с РНК из клубеньков. На рисунке 6.6 (дорожка 3) видно, что хромосомный R' содержит два *EcoRI*-фрагмента, которые гиб-



Рис. 6.6. А—Б. Гибридизация ^{32}P -меченной РНК из вегетативно выращенных бактерий (А) и из клубеньков (Б) с разрезанными *EcoRI* клонами ДНК *R. meliloti*:

дорожки 1 и 2 — R' -плазмиды из мегаплазмиды; дорожка 3 — R' -плазида из хромосомы; дорожка 4 — pEK5022 (рис. 6.5).

ридизуются с клубеньковой РНК. Мутагенез с помощью Tn5 показал, что по крайней мере один из этих фрагментов несет гены симбиоза. Один из указанных генов картируется между хромосомными маркерами *pur-1* и *cys-46* [4]. Результаты изложенных экспериментов позволяют предположить, что гибридизация меченой клубеньковой РНК с геной библиотекой *R. meliloti* может быть полезной для идентификации генов, экспрессирующихся в клубеньках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гены, контролирующие ранние стадии образования клубеньков, структурные *nif*-гены и некоторые другие *fix*-гены (вероятно, *nif*) сгруппированы на участке мегаплазмиды, размер которого составляет около 70 т. п. н. Перенос этого участка в другие виды *Rhizobium* или в *Agrobacterium* приводит к образованию клубеньков Nod⁺ Fix⁻.

Другие *fix*-гены располагаются в четырех различных областях хромосомы. Мы полагаем, что у других ризобий или агробактерий некоторые из этих областей отличаются или отсутствуют. Это означает, что некоторые хромосомные гены *fix* должны проявлять специфичность к растению-хозяину, которую следует учитывать при попытках передачи способности к симбиотической фиксации азота от одного вида *Rhizobium* к другим видам бактерий.

Благодарности. Работа, выполненная в Сегеде (ВНР), частично финансировалась О. М. Ф. В. Один из авторов (Г. Рандхава) был стипендиатом Венгерской академии наук. Значительная часть работы выполнена в Научно-исследовательском институте М. Планка (Кельн, ФРГ), где она субсидировалась Обществом М. Планка, Фондом А. фон Гумбольдта и Университетом Сайнс (Малайзия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Corbin D, Ditta G, Helinski DR (1982) Clustering of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 149:221—228
3. Eckhardt T (1978) A rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 11:584—588
4. Forrai T, Vincze E, Banfalvi Z, Kiss GB, Randhawa GS, Kondorosi A (1982) Location of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 153:635—643
5. Ish-Horowitz D, Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9:2989—2998
6. Johnston AWB, Setchell SM, Beringer JE (1978) Interspecific crosses between *Rhizobium leguminosarum* and *R. meliloti*: formation of haploid recombinants and of *R. primes*. *J Gen Microbiol* 104:209—218
7. Kiss GB, Dobo K, Dusha I, Breznovits A, Orosz L, Vincze E, Kondorosi A (1980) Isolation and characterization of an R-prime plasmid in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 141:121—128

8. Kondorosi A, Kiss BG, Forrai T, Vincze E, Banfalvi Z (1977) Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature* 264:525—527
9. Kondorosi A, Vincze E, Johnston AWB, Beringer JE (1980) A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Mol Gen Genet* 178:403—408
10. Kondorosi A, Banfalvi Z, Broughton WJ, Forrai T, Kiss GB, Kondorosi E, Pankhurst C, Randhawa G, Svab Z, Vincze E (1982a) Localization and molecular genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*. In: Ciferri O, Dure L (eds) *Structure and function of plant genomes*. (in press)
11. Kondorosi A, Kondorosi E, Pankhurst CE, Broughton WJ, Banfalvi Z (1982b) Mobilization of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet* 88:433—439
12. Long SR, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature* 298:485—488
13. Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149:114—122
14. Pankhurst CE (1977) Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast- and slowgrowing strains of *Rhizobium*-nodulating *Lotus* species. *Can J Microbiol* 23:1026—1033
15. Rosenberg C, Boistard P, Dénérié J, Casse-Delbart FL (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a mega-plasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
16. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289:85—88
17. Ruvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559
18. Török I, Kondorosi A (1981) Sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase/*nifH*/gene. *Nucleic Acids Res* 9:5711—5723
19. Trinick MJ (1980) Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobia groups. *J Appl Bacteriol* 49:39—53
20. Vincze E, Koncz C, Kondorosi A (1982) Construction in vitro of R-prime plasmids and their use for transfer of chromosomal genes and plasmids of *Rhizobium meliloti*. *Acta Biol Acad Sci Hung* 32:195—204

7. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ RHIZOBIUM MELILOTI, УЧАСТВУЮЩИХ В СИМБИОТИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ АЗОТА

В. ШЕТО*, Я. ЦИММЕРМАН** и Ф. АУСЮБЕЛЬ*

R. meliloti связывает молекулярный азот в симбиозе с *M. sativa* (люцерна). Процесс развития симбиоза, завершающийся симбиотической фиксацией N_2 , контролируется специальными генами, которые находятся как во вторгающихся бактериях, так и в растении-хозяине [16]. В нашей лаборатории основное внимание уделяется идентификации и описанию генов симбиоза (*sym*) *R. meliloti*, включая те *sym*-гены, которые непосредственно участвуют в азотфиксации (*nif*-гены).

Манипуляции с генами симбиоза у *Rhizobium* затруднены в силу того, что они не экспрессируются в свободноживущих бактериальных клетках. Более того, для изучения *Rhizobium* пригодны лишь очень немногие методы классической генетики. Для преодоления проблем, возникающих при изучении *sym*-генов *Rhizobium*, мы применили экспериментальный подход, сочетающий методы получения рекомбинантной ДНК с транспозонным мутагенезом [10, 11]. В двух словах такой подход заключается в следующем: клонированный фрагмент ДНК *R. meliloti*, содержащий часть оперона структурных генов нитрогеназы (*nifHDK*) [10], использовали в качестве пробы для космидного банка клонов суммарной ДНК *R. meliloti*, чтобы посредством массовой проверки отыскать рекомбинантные плазмиды, несущие перекрывающиеся последовательности ДНК [3]. Было получено несколько рекомбинантных плазмид, несущих участки ДНК, которые примыкают к группе нитрогеназных генов (*nifHDK*) и включают ее. Отобранные рекомбинантные плазмиды были затем мутагенизированы транспозоном Tn5 в клетках *E. coli*. Каждый фрагмент ДНК, несущий вставку Tn5, был внесен обратно в клетки *R. meliloti* посредством гомологичной рекомбинации [11]; симбиотические фенотипы итоговых штаммов *Rhizobium* были проанализированы путем инокуляции растений люцерны каждым штаммом [т. е. необходимо было выяснить, способны ли они индуцировать клубеньки у люцерны

* W. W. Szeto, F. M. Ausubel, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114, USA.

** J. L. Zimmerman, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland 20705, USA.

(Nod⁻ или Nod⁻) и (или) фиксируют ли эти клубеньки N₂ (Fix⁺ или Fix⁻)].

Такой подход позволил идентифицировать, кроме структурных генов нитрогеназы, несколько локусов, ответственных за симбиотическую фиксацию азота, на участке ДНК длиной около 90 т. п. н., который включает группу генов нитрогеназы [3, 12]. Результаты исследования функций некоторых из этих локусов в процессе симбиоза будут описаны ниже. Наиболее интересна идентификация потенциального регуляторного локуса, по-видимому, необходимого для выражения нитрогеназного оперона *nifHDK*.

Ряд штаммов *R. meliloti* Nod⁺Fix⁻, несущих вставку Tn5 в различных участках (полученных с помощью описанного выше сайт-специфичного мутагенеза), использован для индукции неэффективных (Fix⁻) клубеньков у люцерны. Положение вставки Tn5 в этих штаммах относительно нитрогеназного оперона показано на рисунке 7.1. Белки растительного и бактериального (бактероидного) происхождения из таких Fix⁻-клубеньков были очищены и сопоставлены с белками из клубеньков, индуцированных штаммом *Rhizobium* дикого типа. Во всех наших опытах контролем служил штамм *Rhizobium* [1431 — (Nod⁺Fix⁺)], несущий вставку Tn5 на участке ДНК, несущественном для симбиоза, чтобы была уверенность в том, что любые повреждения, вызванные мутациями, являются именно дефектом симбиоза, а не фенотипическим проявлением Tn5-вставок самих по себе. Подробности экспериментов изложены в подписи к рисунку 7.2.

Анализ белков растительного происхождения из мутантных клубеньков показал, что Fix⁻-клубеньки, индуцированные всеми изучавшимися до сих пор мутантами *Rhizobium*, синтезируют значительно меньше леггемоглобина (основной белок клубеньков, синтезируемый растением [4]), чем клубеньки, индуцированные штаммом *Rhizobium* дикого типа (данные не представлены). В настоящее время ведутся эксперименты, цель которых выяснить, все

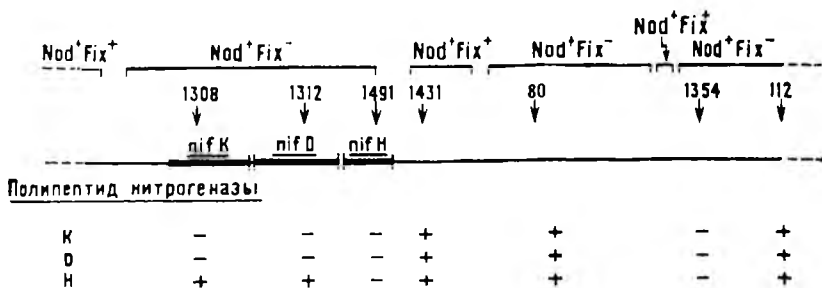
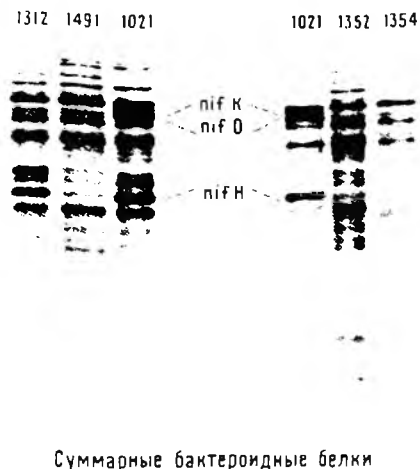


Рис. 7.1. Симбиотические фенотипы различных мутантов *R. meliloti* по симбиозу индуцированных вставкой Tn5. Стрелками указаны положения Tn5-вставок: Nod⁻ — способность индуцировать образование клубеньков; Fix⁺ или Fix⁻ — способность или неспособность клубеньков восстанавливать ацетилен.



Суммарные бактериоидные белки

Рис. 7.2. Профили в ДСН-полиакриламидном геле бактериоидных белков, очищенных из клубеньков, образование которых индуцировано разными штаммами *Rhizobium*. Клубеньки собирали и замораживали в сосудах с жидким азотом. Замороженные клубеньки растирали в мелкий порошок и затем гомогенизировали в буфере, содержащем, 50 мМ Трис (рН 7,5); 20 мМ КДl; 10 мМ MgCl₂; 0,5 мМ маннит; 0,1% PVP и 1мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид). Суспензию фильтровали через 2 слоя «мира»-ткани, бактериониды выделяли из фильтрата центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С (использован ротор Sorvall HB4). Полученный таким образом осадок неочищенных бактериоидов вновь подвергали очистке центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин в градиенте сахарозы 5—20% [содержащий 0,025 М Трис (рН 8,0) и 0,25 М бета-меркаптоэтанол] в роторе HB4 при 4 °С. Фракции отбирали из градиента и проверяли на наличие бактериоидов под микроскопом. Фракции, содержащие бактериониды, объединяли и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Бактериониды из осадка лизировали в буфере, содержащем 25 мМ Трис (рН 7,5); 1 мМ ДТТ (дитиотреитол), 20 мМ Na₂S₂O₄, 1 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид). Растворенные белки затем анализировали в ДСН-полиакриламидных гелях.

ли изоэлектрические варианты леггемоглобина [6] присутствуют в Fix⁻-клубеньках. Изучается также транскрипция леггемоглобина в неэффективных клубеньках. Есть надежда, что с помощью такого рода экспериментов удастся выяснить, является ли уменьшение количества леггемоглобина в Fix⁻-клубеньках прямым следствием снижения скорости транскрипции структурных генов леггемоглобина.

Анализы белков бактериоидного происхождения, выделенных из различных Fix⁻-клубеньков, показали, что в штаммах *R. meliloti*, несущих вставки Tn5 на разных участках оперона структурных генов нитрогеназы (*nif*), отсутствуют некоторые или все три полипептида нитрогеназы. Отсутствие того или иного полипептида определялось положением вставки Tn5 в опероне (рис. 7.1 и 7.2). Бактериониды штамма 1491, несущие вставку Tn5 в гене *nifH*, не синтезировали в обнаружимых количествах полипептиды, кодируемые генами *nifH*, *nifD* и *nifK* (рис. 7.2). Бактериониды штамма 1312, несущего вставку Tn5 в гене *nifD*, содержали полипептид гена *nifH*, но не *nifD* или *nifK* (рис. 7.2). Поскольку вставки Tn5 имеют полярный характер [1], эти данные подтверждают полученные ранее результаты, показывающие, что *nifHDK* транскрибируется как единое целое и что транскрипция начинается с гена *nifH* [12, 13]. Вызывает удивление тот факт, что штаммы, несущие вставки Tn5 в гене *nifK* (например, штамм 1308), дают бактериониды, которые

накапливают продукт гена *nifH* на уровне дикого типа, но не накапливают полипептидов ни гена *nifD*, ни *nifK* (данные не представлены). [В штамме 1308 следовало ожидать наличие полипептидов гена *nifD*, поскольку *nifD* транскрибируется перед *nifK*, поэтому вставка Tп5 в *nifK* не должна оказывать полярного эффекта на *nifD*.] Хотя у нас нет определенного объяснения этому факту, возможны несколько предположений. *NifD* и *nifK* кодируют субъединицы железо-молибденового (FeMo) кофактора нитрогеназного комплекса [9], и оба полипептида могут проявлять нестабильность в отсутствие другого. Возможно также, что каждая полипептидная субъединица в отдельности (*nifD* или *nifK*) не может созревать [белок, содержащий Fe и Mo, созревает перед сборкой в нитрогеназный комплекс (П. Маклин, личное сообщение)], а незрелые полипептиды могут быть нестабильны. Сходные результаты получены также с несущими вставку мутантами *Klebsiella pneumoniae*.

Fix⁻-Мутанты со вставками Tп5 на участке ДНК, расположенном на расстоянии 1—3 т. п. н. справа от *nifH*-промотора (они представлены штаммом 80, рис. 7.1), образуют клубеньки, содержащие бактериоды, которые синтезируют все три нитрогеназных полипептида (данные не представлены). Мутант 112 (рис. 7.1), который несет вставку Tп5 на расстоянии около 8 т. п. н. справа от оперона *nifHDK*, обладает тем же фенотипом в отношении симбиоза (данные не представлены). В настоящее время ведутся эксперименты по выявлению ферментативной активности нитрогеназы, синтезируемой этими мутантами.

В противоположность результатам, полученным с несущими вставку мутантами 80 и 112, участок ДНК, отстоящий примерно на 6 т. п. н. от *nifH*-промотора справа (маркированный вставками Tп5 в штаммах 1354 и 1352), необходим для образования полипептидов нитрогеназы. Ни один из полипептидов — продуктов генов *nifH*, *nifD* или *nifK* — не был обнаружен среди бактериодных белков, очищенных из клубеньков, индуцированных штаммами 1354 и 1352 (рис. 7.2). Данные физического картирования и генетической комплементации [12] (рис. 7.1) показали, что этот локус симбиоза отличается от оперона *nifHDK* и что отсутствие полипептидов, кодируемых генами *nifHDK*, у бактериодов штаммов 1354 и 1352 не является следствием вторичной (вызванной не транспозоном Tп5) мутации в промоторе *nifH*.

Возможно, что участок ДНК, маркированный Tп5-вставками у штаммов 1352 и 1354 («регуляторный» локус), кодирует активатор нитрогеназного (*nif*) оперона. Недавно опубликованы данные, полученные в нашей лаборатории, которые показали, что *nifH*-промотор *R. meliloti* может активироваться *in vitro* белками *K. pneumoniae nifA* или *glnG* [14, 15]. [*K. pneumoniae* (в отличие от *R. meliloti*) фиксирует азот в свободноживущем состоянии. Ген *nifA* *K. pneumoniae* кодирует активатор всех оперонов *nif* этой бактерии [2, 5, 7]. Продукт гена *glnG* служит регулятором основных путей утилизации азота у энтеробактерий [8].] В таких экспериментах по

активации *in vitro* *nifH*-промотор *R. meliloti* был сращен с *lacZ*-геном *E. coli*. Выяснилось, что у штаммов *E. coli*, продуцирующих белки *nifA* или *glnG* конститутивно, промотор *nifH* *R. meliloti* активирован, о чем можно судить по образованию бета-галактозидазы. Поэтому, чтобы проверить, кодирует ли «регуляторный» локус *R. meliloti* *nif*-активатор, аналогичный продукту гена *nifA* или *glnG* *K. pneumoniae*, в настоящее время ведутся следующие опыты: 1) плазмиды, конститутивно определяющие синтез продуктов генов *nifA* *K. pneumoniae* и *glnG* *E. coli*, будут независимо введены в штамм 1354, чтобы проверить, корректируются ли в результате такой комплементации какие-либо дефекты симбиоза; 2) исследуются ростовые характеристики штаммов 1352 и 1354 на средах с различными источниками азота (функция, контролируемая геном *glnG*) и 3) ДНК из «регуляторного» локуса *R. meliloti* будет гибридизована с очищенными фрагментами ДНК *glnG* и *nifA* *K. pneumoniae* для выявления гомологии последовательностей ДНК.

1. Berg DF, Weiss A, Crossland L (1980) Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*. J Bacteriol 142:439—446
2. Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Beynon JL, Cannon FC (1981) Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. Nature 294:776—778
3. Buikema WB, Long SR, Brown SE, Bos RC van den, Earl CD, Ausubel FM (1983) Cosmid cloning of a large region of symbiotic genes from the megaplasmid of *Rhizobium meliloti*. J Mol Appl Genet (in press)
4. Dilworth MJ, Appleby CA (1977) Leghemoglobin and *Rhizobium* hemoproteins. In: Burns RC (ed) A treatise in dinitrogen fixation. John Wiley, New York, p 691
5. Dixon R, Merrick M, Filser M, Kennedy C, Postgate J (1980) Transcriptional organization of the *Klebsiella pneumoniae nif* gene cluster. In: Newton WE, Orme-Johnson WH (eds) Nitrogen fixation, vol I. University Park Press, Baltimore, p 71
6. Jing Y, Paau AS, Brill WJ (1982) Leghemoglobins from alfalfa (*Medicago sativa* L. vernal) root nodules. I. Purification and in vitro synthesis of five leghemoglobin compounds. Plant Sci Lett 25:119—132
7. MacNeil T, MacNeil D, Roberts GP, Supiano MA, Brill WJ (1978) Fine structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 136:253—266
8. Magasanik B (1982) Nitrogen assimilation in bacteria. Annu Rev Genet 16:135—168
9. Roberts GP, MacNeil T, MacNeil G, Brill WJ (1978) Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 136:267—279
10. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc Natl Acad Sci USA 77:191—195
11. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature 289:85—89
12. Ruvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. Cell 29:551—559.
13. Sundaresan V, Ausubel FM (1981) Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae*. J Biol Chem 256:2808—2812
14. Sundaresan V, Jones JDG, Ow DW, Ausubel FM (1983a) *Klebsiella pneumoniae nifA* product activates the *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoter. Nature 301:728—731
15. Sundaresan V, Ow DW, Ausubel FM (1983b) Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoters by *gln* (*ntr*) regulatory proteins. Proc Natl Acad Sci USA 80:4030—4034
16. Vincent JM (1980) Factors controlling the legume *Rhizobium* symbiosis. In: Newton WE, Orme-Johnson WH (eds) Nitrogen fixation, vol II. University Park Press, Baltimore, p 103

8. КАРТИРОВАНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ *nifK*, *nifD* и *nifH* у RHIZOBIUM MELILOTI

А. ПЮЛЕР, В. КЛИПП и Г. ВЕБЕР*

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные виды *Klebsiella pneumoniae* (известна своей способностью к фиксации азота в свободноживущем состоянии) и *Rhizobium meliloti* (способна фиксировать азот в симбиозе с *Medicago sativa*) — две модельные системы, используемые несколькими группами исследователей для изучения генетики процесса биологической азотфиксации. Участки генов фиксации азота (*nif*-области) *K. pneumoniae* [2, 6] и *R. meliloti* [1, 8, 10] были клонированы в клетках *E. coli* и подробно проанализированы. В этой статье рассмотрено картирование кодирующих участков *nifH*, *nifD* и *nifK* *R. meliloti*. Представляет интерес и регуляция транскрипции *nif*-генов *K. pneumoniae* и *R. meliloti*. Мы покажем здесь, что *nifH*-промотор этих видов бактерий активируется продуктом гена *nifA* *Klebsiella*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная система для картирования кодирующих участков на фрагментах, клонированных в составе плазмидных векторов *E. coli*

Для анализа генов фиксации азота (*nif*) *R. meliloti* в клетках *E. coli* мы воспользовались системой, изображенной на рисунке 8.1. Такая система позволяет осуществлять транскрипцию кодирующих участков под контролем конститутивных плазмидных промоторов и идентифицировать генные продукты в мини-клетках *E. coli*. Изолированные мини-клетки, несущие изучаемые плазмиды, инкубируют в присутствии радиоактивно меченных аминокислот. Синтезированные полипептиды разделяют в ДСН-полиакриламидных гелях; визуализация осуществляется с помощью радиоавтографии. Таким методом можно определить молекулярную мас-

** A. Pühler, W. Klipp and G. Weber, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Postfach 8640, 4800 Bielefeld 1, BRD.

су генных продуктов, кодируемых клонированным фрагментом. Используя мутации, индуцированные Tn5-вставкой, и анализируя их в системе мини-клеток, можно даже картировать их кодирующие участки. Логическое обоснование этого метода в общих чертах изложено на рисунке 8.1, *в*: наличие транспозона Tn5 в клонированном фрагменте прерывает транскрипцию в точке вставки. Следовательно, кодирующие участки, расположенные за вставкой Tn5 (по ходу транскрипции), не транскрибируются. Если Tn5-транспозон встроен прямо в кодирующий участок, образуется лишь укороченный полипептид. Зная молекулярную массу такого укороченного полипептида и точное местоположение вставки Tn5, в конечном итоге можно картировать соответствующий кодирующий участок.

Подобная система уже применялась для картирования кодирующих участков на клонированных фрагментах. Например, удалось картировать 15 из 17 кодирующих *nif*-участков *K. pneumoniae* [5]. Аналогичным образом проанализирован *EcoRI*-фрагмент

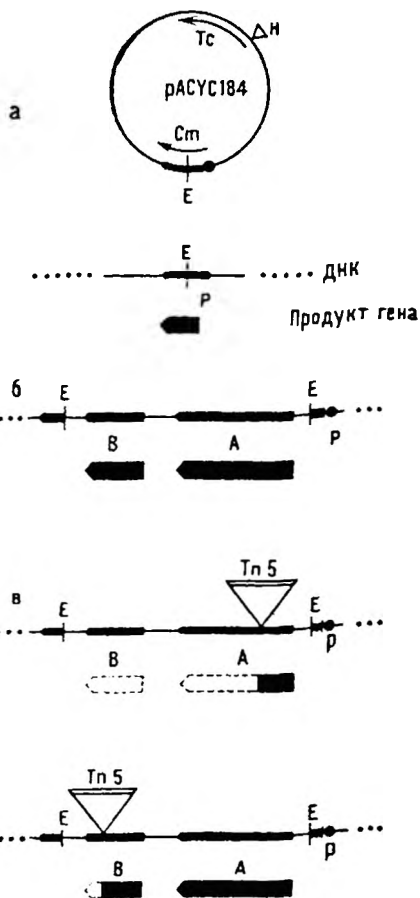


Рис. 8.1, *а—в*. Определение кодирующих участков, расположенных на фрагментах, клонированных встроеными в *EcoRI*-сайт плазмиды pACYC184. *а*. Векторная плаزمида pACYC184, несущая гены устойчивости к тетрациклину (Tc) и хлорамфениколу (Cm). Буквами H и E обозначены сайты действия ферментов рестрикции соответственно *Hind*III и *Eco*RI. Если плазмиду pACYC184 анализировали в мини-клетках (см. текст), то можно было идентифицировать лишь одну четкую полосу белка с молекулярной массой 22 000. Этот белок является хлорамфеникол-ацетилтрансферазой (ХАТ), продуктом гена Cm. *б*. Вставка фрагмента ДНК в *EcoRI*-сайт Cm-гена приводит к присоединению конститутивного Cm-промотора к клонированному фрагменту. Если клонированный фрагмент не содержит сигналы терминации транскрипции, то гипотетические гены A и B находятся под контролем Cm-промотора. *в*. Картирование кодирующих участков, локализованных на клонированных фрагментах, можно осуществить, анализируя различные Tn5-мутанты со вставками в мини-клетках. Подробности изложены в тексте.

участка Т-ДНК октопиновой Ti-плазмиды рTiAch5 и картирована часть кодирующего участка дегидрогеназы лизопина [11]. Другие примеры приведены в этой книге: с помощью системы, описанной в настоящей статье, проанализирована *nif*-ДНК *R. japonicum* (Хеннеке и др.), а также участки Т-ДНК, выделенной из октопиновой и нопалиновой Ti-плазмид (Шредер).

Выражение *nif*-генов *R. meliloti* в мини-клетках *E. coli*

Для выражения *nif*-генов *R. meliloti* в клетках *E. coli* вначале была использована плазида рRmR2 [8], состоящая из векторной плазмиды рACYC184 и вставки ДНК *R. meliloti*, гибридирующей с ДНК генов *nifH* и *nifD Klebsiella*. *EcoRI*-фрагмент плазмиды рRmR2 может быть встроен в векторную плазмиду в двух ориентациях, что приводит к образованию плазмид рRmR2.1 (ориентация 1) и рRmR2.2 (ориентация 2). Анализ генных продуктов плазмиды рRmR2.1 (рис. 8.2) в мини-клетках *E. coli* показал, что вставка ДНК ответственна за двойную полосу в ДСН-полиакриламидном геле, соответствующую белкам с молекулярными массами 30 000 и 31 000 [13]. Другая плазида, обозначенная рID1, с *PstI*-фрагментом ДНК *R. meliloti*, гибридирующим с ДНК генов *nifH* и *nifD Klebsiella*, была сконструирована Банфальви и др. [1]. В наших экспериментах был получен вариант рID1.1 этой плазмиды (рис. 8.2). В дальнейших опытах был использован космидный клон (рRmR29D5), содержащий фрагмент ДНК *R. meliloti*, который гибридуется с ДНК генов *nifK*, *nifD* и *nifH Klebsiella* [10]. На рисунке 8.2 показана часть рестрикционной карты этого фрагмента *R. meliloti*, гибридирующегося с *nif*-ДНК *Klebsiella*. Такие ДНК были субклонированы в составе различных плазмидных векторов *E. coli*. Гибридные плазмиды, которые были получены и использованы для изучения выражения генов в мини-клетках *E. coli*, представлены на рисунке 8.2. Перечислены их свойства и плазмидные промоторы, подсоединенные к вставкам ДНК *R. meliloti*. Все эти плазмиды были проанализированы в мини-клетках. Получены следующие результаты: вставки плазмид рRmW58.1 и рID1.1 образуют те же две белковые полосы в ДСН-гелях, что и плазида рRmR2. В случае плазмид рRmW61.1 и рRmW53.1 наблюдалось лишь по одной очень сильной белковой полосе в полиакриламидных гелях с молекулярной массой 60 000 и 53 000 соответственно.

Следует отметить, что такие же опыты были повторены с плазмидами, у которых ДНК *R. meliloti* была встроена в противоположной ориентации (ориентация 2). Для всех этих плазмид не удалось идентифицировать генные продукты, специфичные для вставок. Лишь слабо проявлялась двойная полоса белков с молекулярными массами 30 000 и 31 000 в случае плазмид рRmR2.2, рRmW58.2 и рID1.2. Это показывает, что промотор, расположенный во вставке ДНК *R. meliloti*, слабо узнается полимеразой *E. coli*.

Наименование плазмиды	Векторная плаزمид	Сайт для клонирования	Использованный промотор
pRm R2.1	pASYC184	<i>EcoRI</i>	P_{Cm}
pRm W58.1	Производная pBR325	<i>HindIII</i>	P_{Cm}
pID1.1	pBR322	<i>PstI</i>	P_{Ap}
pRm W61.1	Производная pASYC184	<i>SmaI</i>	P_{Cm}
pRm W53.1	pASYC184	<i>EcoRI</i>	P_{Cm}

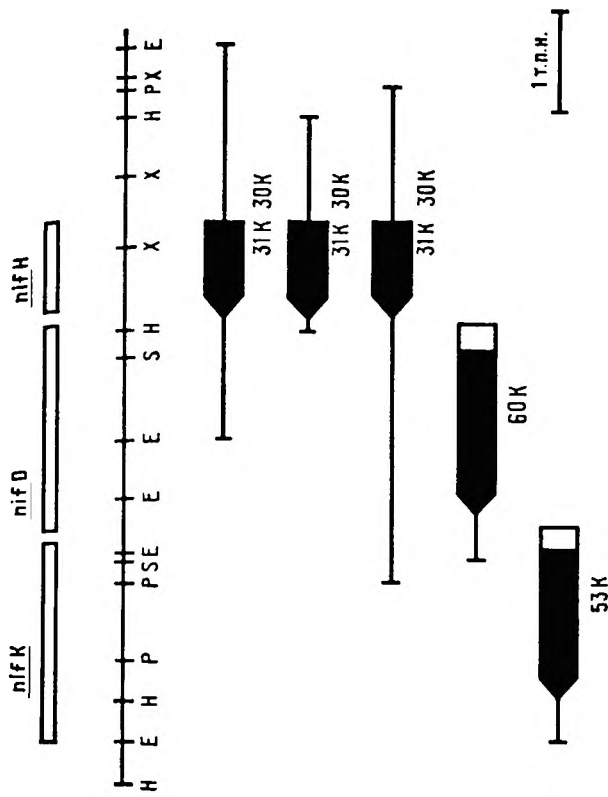


Рис. 8.2. Картирование участка, содержащего гены *nifH*, *nifD* и *nifK* *R. meliloti*. Рестрикционная карта участка ДНК *R. meliloti*, гибридизирующегося с ДНК генов *nifK*, *nifD* и *nifH* *Klebsiella* (незакрашенные полоски), изображена по данным [10]. Субфрагменты этого участка были клонированы в составе различных плазмидных векторов *E. coli*. Перечислены итоговые плазмиды pRmW58.1, pRmW61.1 и pRmW53.1 вместе с pRmR2.1 и pID1.1. Все клонированные фрагменты *R. meliloti* присоединены к специальным плазмидным промоторам P_{Cm} либо P_{Ap} . В случае pRmW58.1 использована векторная плазмид, производная pBR325, у которой Tc-ген находится под контролем промотора P_{Cm} . Для pRmW61.1 клонирован дополнительный, содержащий *SmaI*-сайт фрагмент ДНК, вставленный в *EcoRI*-сайт промотора P_{Cm} . Кодированные участки, локализованные на этих субфрагментах *R. meliloti* и экспрессированные в мини-клетках *E. coli*, показаны черными толстыми стрелками. Указаны молекулярные массы соответствующих генных продуктов: P_{Ap} — промотор гена устойчивости к ампициллину; P_{Cm} — промотор гена устойчивости к хлорамфениколу.

Все фрагменты *R. meliloti*, анализировавшиеся до сих пор, гибридизуются с *nif*-ДНК *Klebsiella*, кодирующей структурные гены нитрогеназы (рис. 8.2). Поэтому можно предположить, что полипептиды, детерминированные этими фрагментами, являются продуктами генов *nifH*, *nifD* и *nifK* *R. meliloti*. Чтобы подтвердить это предположение, участки, кодирующие указанные полипептиды, картировали на различных фрагментах *R. meliloti*.

Картирование кодирующей области *nifH*, *nifD* и *nifK* *R. meliloti*

Как показано на рисунке 8.1, участки, кодирующие полипептиды, идентифицированные в мини-клетках *E. coli*, были картированы с помощью вставок Tn5. На рисунке 8.3 показано картирование участка плазмиды pRmW53.1, кодирующего полипептид с молекулярной массой 53 000. На фрагменте ДНК *R. meliloti* локализованы 10 различных Tn5-вставок и с помощью мини-клеток определены молекулярные массы соответствующих укороченных полипептидов.

Все эти данные изображены на рисунке 8.3, из которого явствует, что полипептид 53 000 представляет собой сращенный белок, кодирующий участок которого начинается на плазмидном векторе pACYC184 и покрывает большую часть ДНК-вставки *R. meliloti*.

Мы предполагаем, что такой сращенный белок частично состоит из хлорамфениколацетилтрансферазы (ХАТ), детерминированной плазмидой pACYC184 (рис. 8.1), и частично из продукта *nifK*-гена *R. meliloti*. Последнее предположение основано на данных по гибридизации с *nifK*-ДНК *Klebsiella* (рис. 8.2) [10] и подтверждается также тем, что полипептид 53 000 образуется с высокой эффективностью.

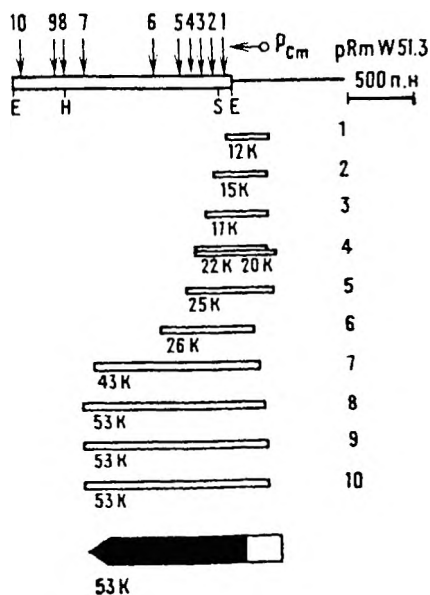


Рис. 8.3. Картирование кодирующего участка *nifK* *R. meliloti* на плазмиде pRmW53.1. Показана часть линейной рестрикционной карты плазмиды pRmW53.1. Картированы 10 различных Tn5-вставок (показаны стрелками). Под рестрикционной картой представлены в масштабе кодируемые участки, экспрессируемые в мини-клетках *E. coli* от *Sp*-промотора P_{cm}. Указаны молекулярные массы генных продуктов. Сокращения те же, что и на рисунке 8.2.

Ситуация оказалась иной в случае плазмиды pRmR2.1. Здесь кодирующий участок целиком располагается в пределах вставки [13]. На рисунке 8.2 указано точное местоположение этого кодирующего участка, который определяет две полосы белков с молекулярными массами 30 000 и 31 000. Мы пришли к заключению, что данный кодирующий участок идентичен *nifH*-гену *R. meliloti* по двум причинам: во-первых, он гибридизуется с *nifH*-ДНК *Klebsiella* (рис. 8.2) [9]; во-вторых, определение нуклеотидной последовательности этого участка [12] выявило открытую рамку считывания, кодирующую белок в высокой степени родственный продукту гена *nifH Klebsiella*.

Следует более подробно обсудить белок с молекулярной массой 60 000, определяемый плазмидой pRmW61.1. Хотя картирование соответствующего кодирующего участка не проводилось, исходя из его эффективного выражения в мини-клетках *E. coli*, мы заключили, что полипептид 60 000 вновь представляет собой сращенный белок, содержащий часть белка ХАТ и часть продукта *nifD*-гена *R. meliloti*. *nifD*-Ген *R. meliloti* опять был идентифицирован по его способности гибридизоваться с *nifD*-ДНК *Klebsiella* [10]. На рисунке 8.2 показано предполагаемое местоположение участка, кодирующего сращенный полипептид 60 000.

Наконец, стоит отметить следующий результат. Плазмида pID1.1 содержит вставку, включающую гены *nifH* и *nifD R. meliloti* (рис. 8.2). Эту плазмиду анализировали в мини-клетках. Оказалось, что в отличие от продукта гена *nifH*, продукт гена *nifD* не синтезируется. Поскольку известно, что гены *nifH*, *nifD* и *nifK R. meliloti* локализованы в едином опероне [10], можно предположить, что ген *nifD* в клетках *E. coli* не транскрибируется. Одно из объяснений состоит в существовании слабого или регулируемого сайта связывания рибосом перед геном *nifD*.

Регуляция промотора области *nif* УКДН *K. pneumoniae* продуктами генов *nifA* и *nifL* в клетках *E. coli*

Следующий важный вопрос после картирования кодирующих участков *nifH*, *nifD* и *nifK R. meliloti* — контроль транскрипции указанных генов. С этой целью нами были сконструированы специальные плазмиды, названные pWK130 и pWK131, которые необходимо были использованы для исследования транскрипции *nif*-оперонов *K. pneumoniae*. Рестрикционные карты указанных плазмид изображены на рисунке 8.4. Плазмида pWK130 происходит от плазмидного вектора pACYC177 [3]. Ген устойчивости к ампициллину (Ap) был инактивирован вставкой *Pst*I-фрагмента, детерминирующего устойчивость к хлорамфениколу (Cm), который берет начало от профага P1Cmts [7]. *Hind*III-Сайт гена устойчивости к канамицину (Km) использовали для клонирования *Hind*III-фрагмента, который содержит промотор локуса устойчивости к хлорамфениколу (P_{Cm}), сцепленный с генами *nifL* и *nifA Klebsiella*.

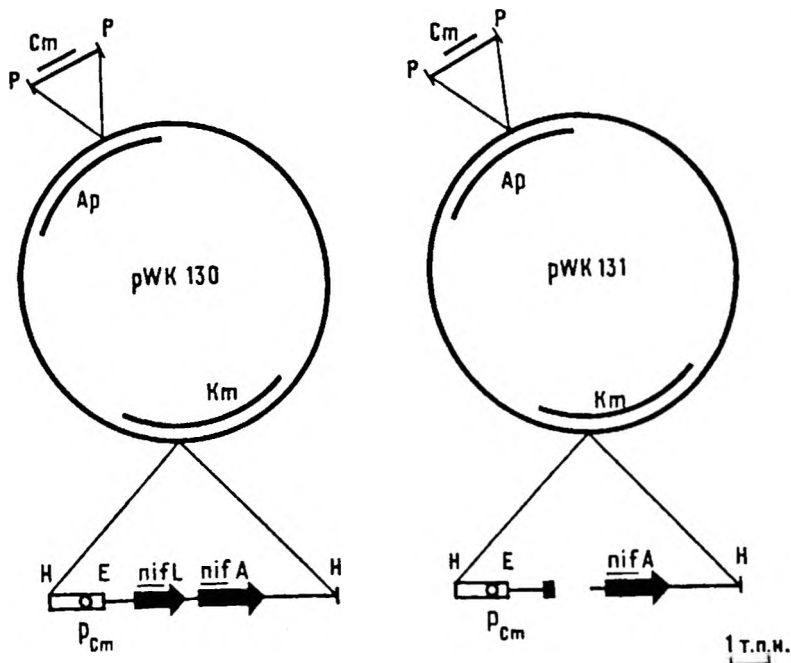
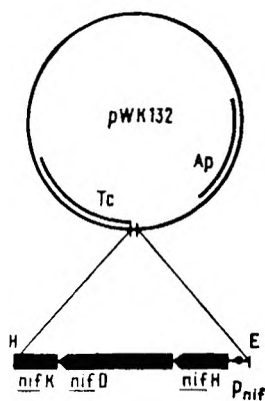


Рис. 8.4. Рестрикционные карты плазмид pWK130 и pWK131, на которых конститутивно экспрессируются гены *nifL* и *nifA* *Klebsiella*. Эти плазмиды содержат векторную плазмиду *E. coli* pACYC177. Ap-ген был инактивирован вставкой *Pst*I-фрагмента, несущего Cm-ген фара P1Cmts. *Hind*III-сайтом Km-гена плазмиды pWK130 воспользовались для клонирования *Hind*III-фрагмента, содержащего гены *nifL* и *nifA*, которые находятся под контролем конститутивного *Сm*-промотора плазмиды pACYC184. Плазмида pWK131 отличается от pWK130 делецией большей части кодирующего участка гена *nifL*. Сокращения те же, что и на рисунке 8.2.

В отличие от pWK130 плазмида pWK131 содержит делецию, удалившую большую часть *nifL*-гена.

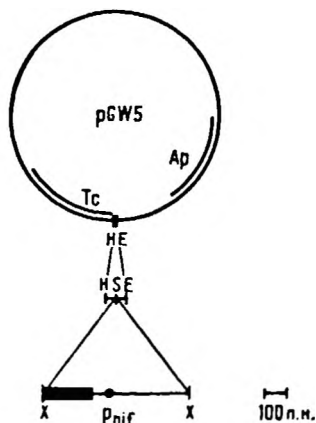
Плазмиды pWK130 и pWK131 важны в том отношении, что они направляют синтез регуляторных белков, необходимых для транскрипции *nif*-участка *Klebsiella* [4]. Продукт гена *nifA* (*nifAgp*) считают активатором транскрипции *nif*-оперонов *Klebsiella*, тогда как продукт гена *nifL* (*nifLgp*) действует как антиактиватор или репрессор транскрипции. Это может быть продемонстрировано с помощью плазмиды pWK132, которая была сконструирована следующим образом. Мы клонировали *Hind*III-*Eco*RI-фрагмент *nif*-участка *Klebsiella*, содержащего часть оперона *nifYKDH* в составе pBR322. Тем самым промотор оперона *nifYKDH* оказался присоединенным к лишенному промотора Tc-гену (рис. 8.5). Поэтому активация промотора *nifYKDH* должна быть сопряжена с устойчивостью к тетрациклину. Такая активация промотора *nifYKDH* продуктом гена *nifA* *Klebsiella* была продемонстрирована созданием штамма *E. coli*, содержащего pWK131 и pWK132. Обе эти плазмиды

ды совместимы, так как они содержат различные репликоны — соответственно рACYC177 и рBR322. В контрольном опыте использован штамм *E. coli*, содержащий рWK130 и рWK132. В последнем случае присутствие *nifLgr* в подходящих условиях (при доступе кислорода) должно подавлять *nifA*-зависимую активацию промотора. Результаты эксперимента сведены на рисунке 8.5. Продукт гена *nifA* активирует промотор *nifYKDH*. Если кроме *nifAgr*



Штамм <i>E. coli</i> HB101, содержащий плазмиды	Температура	
	30°C	44°C
рWK131: <i>nifA</i> рWK132: Tc	Tc ^r	Tc ^s
рWK130: <i>nifA nifL</i> рWK132: Tc	Tc ^s	Tc ^s

Рис. 8.5. Анализ регуляции промотора области *nifYKDH* *K. pneumoniae* в клетках *E. coli*. Плазмида рWK132 содержит векторную плазмиду *E. coli* рBR322. *EcoRI-HindIII*-фрагмент, несущий часть промотора гена Tc, заменен на *EcoRI-HindIII*-фрагмент *nif*-области *Klebsiella*, содержащей часть оперона *nifYKDH*. С помощью этой манипуляции Tc-кодирующий участок присоединен к промотору *nifYKDH* *Klebsiella*. Так как плазмида рWK132 совместима с рWK130 и рWK131, то появилась возможность изучать влияние *nifAgr* и *nifLgr* *Klebsiella* на регуляцию промотора *nifYKDH*. Сокращения те же, что и на рисунке 8.2.



Штамм <i>E. coli</i> HB101, содержащий плазмиды	Температура	
	30°C	44°C
рWK131: <i>nifA</i> рGW5: Tc	Tc ^r	Tc ^s
рWK130: <i>nifA nifL</i> рGW5: Tc	Tc ^s	Tc ^s

Рис. 8.6. Анализ регуляции *nifH*-промотора *R. meliloti* продуктами генов *nifA* и *nifL* *K. pneumoniae* в клетках *E. coli*. Плазмида рGW5 содержит векторную плазмиду *E. coli* рBR322. Tc-Ген инактивирован вставкой небольшого *HindIII-EcoRI*-фрагмента плазмиды рUC8. Эта вставка выводит из строя промотор Tc-гена. *XhoI* — фрагмент, несущий *nifH*-промотор *R. meliloti* и часть *nifH*-кодирующего участка, был клонирован вставленным в *Sall*-сайт (S), имеющийся на *HindIII-EcoRI*-фрагменте. Этой манипуляцией Tc-кодирующий участок переведен под контроль *nifH*-промотора *R. meliloti*. Плазмида рGW5 совместима с рWK130 и рWK131. Таким образом, получена возможность изучать влияние *nifAgr* и *nifLgr* *Klebsiella* на регуляцию *nifH*-промотора *R. meliloti*. Сокращения те же, что и на рисунке 8.2.

присутствует также и *nifLgr*, активация *nif*-промотора не обнаруживается. В дальнейшем контрольном эксперименте воспользовались термочувствительностью *nifAgr* [14]. Активация *nif*-промотора происходила только при 30 °С, но не при 45 °С. Результаты этих экспериментов четко продемонстрировали роль *nifAgr* и *nifLgr* в регуляции промотора *nifYKDH Klebsiella*. В следующем разделе мы покажем, что *nifAgr* и *nifLgr Klebsiella* регулируют также выражение *nifH*-промотора *R. meliloti*.

Регуляция *nifH*-промотора *R. meliloti* продуктами генов *nifA* и *nifL* *K. pneumoniae* в клетках *E. coli*

Для изучения регуляции *nifH*-промотора *R. meliloti* была сконструирована плаزمида, подобная рWK132. Рестрикционная карта этой плазмиды, названной рGW5, представлена на рисунке 8.6. И на этот раз мы начали с рBR322 и клонировали небольшой *HindIII-EcoRI*-фрагмент, происходящий от плазмиды рUC8 (Мессинг, *неопубликованные данные*), содержащей *Sall*-сайт. Созданная в итоге плаزمида чувствительна к тетрациклину. Мы клонировали в этот *Sall*-сайт *XhoI*-фрагмент (рис. 8.2), который содержал *nifH*-промотор *R. meliloti*. Итак, *nifH*-промотор вновь оказался присоединенным к лишенному промотора Тс-гену. Плазмиду рGW5 теперь испытывали в сочетании с рWK130 или рWK131 на экспрессию устойчивости к тетрациклину. Вновь получены те же результаты, что и в случае плазмиды рWK132 (рис. 8.6): *nifAgr Klebsiella* способен активировать *nifH*-промотор *R. meliloti* при 30 °С. При 45 °С или в присутствии *nifLgr Klebsiella* такая активация подавлена. Следует обратить внимание на то, что в данном эксперименте совместно работают клеточные компоненты от трех разных видов бактерий: *nifH*-промотор *R. meliloti*, активированный продуктом гена *nifA* *K. pneumoniae*, узнается РНК-полимеразой *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В описанных экспериментах показано, каким образом были картированы кодирующие участки *nif*-генов *R. meliloti* на фрагментах, клонированных в клетках *E. coli*. Изучена также регуляция промотора путем присоединения *nifH*-промотора *R. meliloti* к лишенному промотора гену Тс. Данная система теперь может быть использована в дальнейших опытах по клонированию «*nifA*-подобного» гена *R. meliloti*. Кроме того, можно исследовать вопрос о том, обладает ли *R. meliloti* «*nifL*-подобным» геном. Наконец, как свидетельствуют результаты данной работы, методы генетической инженерии, разработанные на *E. coli*, могут быть с успехом применены для анализа генов *R. meliloti*, ответственных за фиксацию азота. Подобные методы могут оказаться полезными при анализе генов, ответственных за образование клубеньков у *R. meliloti*.

Благодарности. Мы хотели бы выразить искреннюю признательность коллегам, которые помогли нам в проведении экспериментов: Ф. Аусюбелю, который предоставил нам pRmR2 и pRmR29D5, и А. Кондороши за плазмиду pID1. Мы благодарим также В. Кришнапиллаи за помощь и М. О'Коннеллу за обсуждение и критические замечания к рукописи. Далее, мы хотели бы поблагодарить Б. Гронеймайер, одну из наших студенток, за выделение Tn5-мутантов, У. Байгель за техническую помощь и С. Мальмиваара за кропотливую перепечатку рукописи. Работа финансировалась Немецким научно-исследовательским объединением и Федеральным министерством по науке и технике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Cannon FC, Reidel GE, Ausubel FM (1979) Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterised. *Mol Gen Genet* 174:59—66
3. Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *Bacteriology* 134:1141—1156
4. Kennedy C, Cannon F, Cannon M, Dixon R, Hill S, Jensen J, Kumar S, McLean P, Merrick M, Robson R, Postgate J (1981) Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Gibson AH, Newton WE (eds) *Current perspectives in nitrogen fixation*. Aust Acad Sci, Canberra, pp 146—156
5. Pühler A, Klipp W (1981) Fine structure analysis of the gene region for N₂-fixation (*nif*) of *Klebsiella pneumoniae*. In: Bothe H, Trebst A (eds) *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 275—286
6. Pühler A, Burkardt HJ, Klipp W (1979) Cloning of the entire region for nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* on a multicopy plasmid vehicle in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 176:17—24
7. Rosner JL (1972) Formation, induction and curing of bacteriophage P1 lysogens. *Virology* 48:679—689
8. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
9. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289:85—89
10. Ruvkun GB, Sundareshan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559
11. Schröder J, Hillebrand A, Klipp W, Pühler A (1981) Expression of plant tumor-specific proteins in minicells of *Escherichia coli*: a fusion protein of lysopine dehydrogenase with chloramphenicol acetyltransferase. *Nucleic Acids Res* 9:5187—5194
12. Török I, Kondorosi A (1981) Sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. *Nucleic Acids Res* 9:5711—5723
13. Weber G, Pühler A (1982) Expression of *Rhizobium meliloti* genes for nitrogen fixation in *Escherichia coli* minicells: Mapping of the subunit of the nitrogenase reductase. *Mol Plant Biol* 1:305—320
14. Zhu J, Brill WJ (1981) Temperature sensitivity of the regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 145:1116—1118

9. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ РАННИЕ СТАДИИ ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ У RHIZOBIUM MELILOTI

С. ЛОНГ, Т. ДЖЕКОБС, Д. БИБ и Т. ЭГЕЛЬХОФ *

ВВЕДЕНИЕ

Нас интересуют ранние этапы взаимодействия между *Rhizobium* и бобовыми растениями, такие, как узнавание, прикрепление и инвазия бактериями растения-хозяина. Ранние этапы процесса формирования клубеньков изучались биохимическими методами и с помощью микроскопа, но пока нет ясного понимания того, что происходит на молекулярном уровне. Мы надеемся лучше понять сущность этих ранних этапов, используя мутанты и клонированные гены.

До сих пор большая часть работ, посвященных изучению ранних стадий образования клубеньков, касалась химии взаимодействующих поверхностей бактерий и хозяев в связи с их возможной ролью в формировании клубеньков (см. последние обзоры [2, 10]). Исследователей больше всего интриговал вопрос круга хозяев: почему индивидуальные штаммы *Rhizobium* формируют клубеньки только на некоторых, а не на всех растениях-хозяевах? Имеются данные, свидетельствующие о том, что в некоторых системах свойства оболочек бактериальных клеток, такие, как их полисахаридный состав, могут определять специфическое взаимодействие бактерий с белками растения, например с лектинами. Однако однозначные биохимические корреляции были обнаружены не во всех системах *Rhizobium* — растение-хозяин. Отчасти это может быть обусловлено модификацией бактериальных полисахаридов под влиянием условий культивирования, а в некоторых системах — под воздействием экссудатов корней.

На основании этих и других данных было высказано предположение, что узнавание осуществляется в несколько этапов, в ходе которых бактерии и хозяин обмениваются сигналами и реагируют друг на друга [2, 10]. Природа таких сигналов и ответов неизвестна и может зависеть от экспрессии генов.

Один важный вопрос, на который можно получить ответ, клонируя гены, ответственные за образование клубеньков, заключа-

* S. P. Long, T. Jacobs, D. Beebe, T. Egelhoff, Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA.

ется в следующем: выражаются ли эти гены в свободноживущих бактериальных клетках или только в присутствии растения-хозяина? Ответ на этот вопрос может объяснить различное поведение разных штаммов *Rhizobium*. Таким образом, инициация симбиоза *Rhizobium* с бобовыми растениями, по-видимому, процесс сложный и тонкий. В таких системах трудно выявить причинно-следственные связи с помощью одного лишь биохимического анализа. В отличие от него генетический анализ дает возможность расчленить весь процесс на отдельные этапы и проследить цепь последовательных событий.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ

При исследовании генов, ответственных за образование клубеньков, мы воспользовались наличием набора видов *Rhizobium* с различными спектрами растений-хозяев и прибегали также к индукции мутантов. В такого рода исследованиях существенно иметь возможность передавать гены от одного штамма в другой для выявления их действия в различном окружении и в разных комбинациях. К тому же желательно клонирование интересующих нас генов, чтобы иметь возможность изучать их интимные свойства и регуляцию их выражения на молекулярном уровне.

Идентификации генов, контролирующих образование клубеньков, и анализу их активности способствовало то, что у некоторых форм *Rhizobium* они локализованы на трансмиссивных плаزمидах [5, 6, 7, 15, 25]. Перенос таких плазмид может восстанавливать функции некоторых мутантов, дефектных по образованию клубеньков, и изменять круг хозяев реципиентных клеток *Rhizobium*. Подобные плазмиды первоначально были изучены у родственных быстрорастущих штаммов *R. leguminosarum*, *R. trifolii* и *R. phaseoli*. Сходные результаты теперь получают для некоторых штаммов *Rhizobium* с широким кругом хозяев (Пэнкхерст и др., Ронсон и Скотт, Рольф и др., в данном сборнике). Некоторые природные плазмиды *Rhizobium* придают способность к индукции клубеньков на бобовых растениях клеткам *Agrobacterium* [14].

Что касается *R. meliloti*, то здесь ситуация иная, поскольку эти бактерии несут гены симбиоза, включая гены азотфиксации и образования клубеньков, на очень крупной «мегаплазмиде» и не способны к ее автономному переносу в условиях, пригодных для других плазмид [1, 22]. Поэтому для изучения таких генов, в частности для выяснения их локализации в плазмиде и функционирования в различном окружении, потребовались методы, отличные от тех, которые применялись для других быстрорастущих штаммов. Например, Банфальви и др. [1] и Розенберг и др. [22] индуцировали мутации, затрагивающие образование клубеньков, с помощью таких методов (например, тепловое воздействие), которые часто приводят к исцелению от плазмид или делециям. Они показали,

что такие мутанты — действительно делеционные производные, утратившие часть мегаплазмиды.

Другой подход к изучению генов, ответственных за ранние этапы образования клубеньков, — это индукция мутаций в отдельных локусах генома *Rhizobium* и их массовая проверка с целью выявления мутантов, дефектных по способности формировать клубеньки, что позволяет идентифицировать отдельные звенья в цепи начальных этапов формирования клубеньков и анализировать соответствующие события [24]. Вставки транспозонов порождают мутации нулевого типа, которые можно картировать, используя маркеры транспозонов, определяющие устойчивость к антибиотикам.

Мид и др. [17], а также Лонг и др. [16] описали использование этого метода для идентификации мутантов по симбиозу у штамма *R. meliloti* 1021. Для картирования Tn5-индуцированных симбиотических мутантов воспользовались комбинацией физических и генетических методов. Локусы, располагающиеся на хромосоме, картировали по частоте совместного переноса с известными хромосомными маркерами [17]. Мутации, которые проявлялись как нехромосомные, были локализованы на мегаплазмиде с помощью анализа ДНК мутантного штамма в геле по методу Экхарда и переноса на фильтры по Саузерну (Буйкема и др., в печати). В условиях таких опытов в мегаплазмидной полосе хромосомной ДНК не содержится, о чем свидетельствует отсутствие гибридизации на фильтре с этой полосой хромосомных последовательностей ДНК.

С помощью такого метода слежения за Tn5-вставками на мегаплазмиде были локализованы *nif*-гены, а также гены, вызывающие скручивание корневых волосков (*Nac*-гены). Tn5-Мутации использованы также для их локализации на плазмидах в других системах в опытах по переносу плазмид у штаммов *R. leguminosarum* [8, 15], а также у *R. trifolii* и *R. parasponia* (Рольф и др. в данном сборнике).

МУТАНТЫ ПО ОБРАЗОВАНИЮ КЛУБЕНЬКОВ 1027 И 1126

Мы сосредоточили внимание на двух мутантах *R. meliloti* 1027 и 1126. Оба эти Tn5-содержащих мутанта происходят от родительского штамма 1021 [16, 17]. Оба штамма являются Nod⁻, т. е. не индуцируют клубеньки при инокуляции растений-хозяев люцерны. Как показывают результаты микроскопирования, они не вызывают у корневых волосков хозяина скручивания или какой-либо другой явной деформации [13].

Предварительное исследование поверхности клеток у мутантов 1027 и 1126 не выявило каких-либо отличий от родительского штамма дикого типа 1021. Они продуцируют нормальное количество внеклеточного полисахарида (Дж. Дарвилл и П. Альберсхайм, личное сообщение). Продуцируемый ими липополисахарид не был охарактеризован. По нашим данным, они обладают одинаковой

родительским штаммом чувствительностью к фагам (М. Мартин и С. Лонг, *неопубликованные данные*). Э. Йохансон и Э. Сигнер (*личное сообщение*) установили, что моноклональные антитела против компонентов поверхности клеток дикого типа *R. meliloti* нормально связываются с обоими мутантами. Рольф и др. [20] сообщили, что *Nod*⁻-мутанты *R. trifolii* распадаются на две группы в зависимости от того, возможно или невозможно оказать им «помощь» для развития в клубеньках за счет совместной инфекции с клетками ризобий Fix⁻ или дикого типа. Мы установили, что мутанты 1027 и 1126 относятся к группе мутантов, «помощь» которым в клубеньках может быть оказана.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

Чтобы лучше понять природу мутаций в этих штаммах и таким образом охарактеризовать этапы формирования клубеньков, на которые они влияют, мы исследуем мутантные участки на уровне ДНК. Их клонирование описано Лонгом и др. [16]. Вкратце метод заключается в следующем: был создан банк фрагментов ДНК дикого типа, клонированных в составе космидного вектора с широким кругом хозяев pLAFR1 [12], который является *cos*-содержащим производным плазмиды pRK290 [11]. Этот банк клонов путем конъюгации был внесен в каждый из *Nod*⁻-мутантов.

Среди *Nod*⁻-клеток, несущих рекомбинантные плазмиды, небольшая субпопуляция будет содержать плазмиду, которая включила гены, контролирующие образование клубеньков дикого типа. Если такой сегмент ДНК дикого типа комплементирует в клетке мутированные гены, то клетка будет вести себя так, как если бы она была *Nod*⁻. Растение, инокулированное смесью *Nod*⁻-мутантов и «*Nod*⁺»-комплементированных мутантов, должно обеспечить отбор субпопуляции «*Nod*⁻», индуцирующей клубеньки, которые содержат такие клетки. Бактерии, содержащиеся в клубеньках, могут быть изолированы и их плазмиды проанализированы. Таким путем был выделен рекомбинантный клон pRmSL26. Он придает обоим мутантам, 1126 и 1027, способность скручивать корневые волоски и индуцировать образование клубеньков.

Чтобы проанализировать эффект генов *R. meliloti*, клонированных в плазмиде pRmSL26, она была перенесена в два других штамма *Rhizobium*: *R. trifolii* Rt37 и *R. leguminosarum* 897. Конъюгаты были очищены до отдельных колоний и использованы для инокуляции проростков люцерны. Клубеньки на этих растениях не появились. В данном случае возможно несколько объяснений: либо генов, клонированных в составе pRmSL26, недостаточно для формирования клубеньков, либо они не экспрессируются, либо генный продукт *nod*-участка *R. meliloti* не доминирует фенотипически над диким типом других штаммов (см. ниже). Последние два объяснения кажутся более правдоподобными, поскольку Хирш

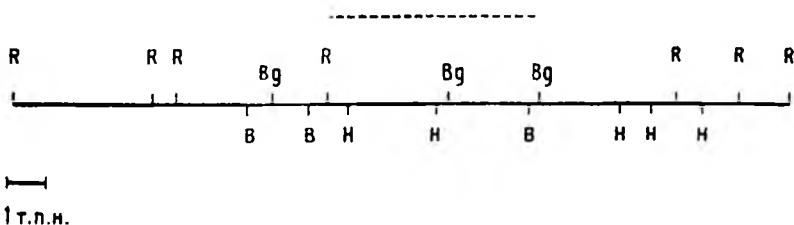


Рис. 9.1. Рестрикционная карта ДНК *R. meliloti*, встроенной в рекомбинантную плазмиду pRmSL26. Эти последовательности располагаются на мегаплазмиде *R. meliloti*; *nif*-последовательности найдены на расстоянии примерно 18 т.п.н. справа от правого конца показанного здесь участка. Tn5-Вставки в самом крупном *EcoRI*-фрагменте, длина которого равна около 8,7 т.п.н., приводят к возникновению *nod*-мутации. Пунктирная линия указывает участок, транскрибируемый в бактероидах. Положение двух крайних левых фрагментов определено не точно, возможно, их надо поменять местами:

R — *EcoRI*; B — *Bam*III; H — *Hind*III; Bg — *Bg*III. Размеры *EcoRI*-фрагментов (слева направо) 3.5; 0.6; 3.8; 8.7; 1.7 и 1.25 т. п. н.

и Уилсон (см. статью в данном сборнике) показали, что pRmSL26 может придавать *A. tumefaciens* способность индуцировать клубеньки на люцерне с низкой частотой.

На pRmSL26 были картированы несколько сайтов рестрикции, как показано на рисунке 9.1. С помощью рестриктов ДНК этой плазмиды было начато изучение экспрессии генов образования клубеньков в клетках *R. meliloti*. Экспрессию генов измеряли посредством гибридизации РНК из свободноживущих клеток или бактероидов с клонированными фрагментами ДНК. РНК, экстрагированную из клеток, подвергали умеренному гидролизу и метилили ^{32}P , а затем использовали в качестве пробы для гибридизации по Саузерну на фильтрах с ДНК из участка, ответственного за образование клубеньков, т. е. из участка *nif* [23] и из локусов контролирующего метаболизм триптофана [12].

Мы обнаружили, что, как и предполагалось, РНК из бактероидов эффективно гибридизуется с *nif*-последовательностями и что кроме того, она гибридизуется с *EcoRI*-фрагментом размером 8,7 т. п. н., содержащимся в pRmSL26. Двойное расщепление вставки ДНК pRmSL26 с последующей гибридизацией с меченой бактероидной РНК показывает, что экспрессируется лишь часть фрагмента 8,7 т. п. н.; этот участок указан пунктирной линией на рисунке 9.1. Когда данный опыт был повторен с РНК из свободноживущих клеток, оказалось, что она, как и следовало ожидать, гибридизуется с клоном ДНК, ответственным за метаболизм триптофана.

Однако с последовательностями, интегрированными в pRmSL26, гибридизация не была обнаружена. Следовательно, исходя из результатов, полученных на данном уровне чувствительности, можно заключить, что гены образования клубеньков *R. meliloti*, детерминирующие скручивание корневых волосков люцерны в свободноживущих клетках, видимо, не экспрессируются или эк

прессироваться очень слабо. Для более подробного описания изучаемых участков мы получили Tn5-вставки в различные фрагменты и будем определять фенотип таких несущих вставки мутантов методом Рувкуна и Аусюбея [23]. Во вспомогательных опытах мы используем бактериоидную РНК для установления уровня транскрипции у клона pRmSL26.

УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ МЕТОДА КЛОНИРОВАНИЯ *nod*-ГЕНОВ

Использование комплементационного отбора с участием растения-хозяина для выделения *nod*-клонов может найти широкое применение в манипуляциях с определенными типами генов. Такой подход, вероятно, позволит клонировать гены, несущие точечные мутации или небольшие делеции.

Он может быть полезен при работе с мутантными штаммами, изолированными после химического мутагенеза или теплового воздействия.

Чтобы подобный метод был эффективным, требуется выполнение нескольких условий, которые налагают ограничения на выбор типа генов для клонирования. Во-первых, важно, чтобы комплементированные мутантные клетки («дикого типа») обладали способностью успешно конкурировать с другими клетками. Отсюда вытекает наиболее очевидное следствие, что лишь мутанты, дефектные по ранним стадиям процесса, на которых, очевидно, проявляется избирательность растения, будут неконкурентоспособными.

Мутант, единственный дефект которого сказывается на одной из поздних стадий развития, на ранних этапах будет неотличим от дикого типа. Следовательно, метод комплементации, вероятно, применим лишь для клонирования генов, контролирующих ранние этапы симбиоза.

Вполне возможно, что даже в случае мутантов, дефектных по ранним этапам, клетки дикого типа не будут иметь преимущества перед мутантами и потому не смогут избирательно индуцировать образование клубеньков у хозяина. Например, можно представить, что некоторые мутанты способны сорбироваться на растении-хозяине в гипотетических «местах прикрепления», насыщая эти места, но не способны завершить следующий этап симбиотических взаимоотношений. Клетки дикого типа не смогут добраться до таких мест, и растение останется без клубеньков. Возможен другой вариант, когда определенные типы мутантов вызовут защитные реакции хозяина, которые предотвратят успешное проникновение клеток дикого типа в ткани растения.

Необходимо учитывать еще одно условие доминантности гена дикого типа над мутантным геном в бактериальной клетке. В случае транспозонных мутантов осложнений, видимо, не возникает, поскольку Tn5 индуцируют мутанты нулевого типа, у которых продукт гена отсутствует. Но при попытке комплементировать мута-

ции, индуцированные такими мутагенами, как нитрозогуанидин, или ему подобными, которые приводят к появлению миссенс-мутации, вполне возможно, что дефектный продукт мутированного гена фенотипически может доминировать над нормальным продуктом клонированного гена дикого типа. Если для проявления активности продукта гена образования клубеньков необходима его ассоциация с другими компонентами, например включение в мембрану или сборка в мультипептидный комплекс, то дефектный продукт может снизить вероятность того, что нормальный продукт будет активным. Наконец, существует возможность того, что некоторые продукты генов образования клубеньков осуществляют регуляторную функцию и аномальный генный продукт может оказаться доминантным в силу природы его действия.

КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ ДРУГИХ МУТАНТОВ

Мы сделали попытку воспользоваться методом, описанным Лонгом и др. [16], для клонирования генов *R. meliloti*, которые восстанавливают функцию трех мутантов, индуцированных нитрозогуанидином в штамме *R. meliloti* 102F51. Такие мутанты, изолированные и изученные ранее [18], являются Nod⁻; они получили название WL113, WL131 и WL188. WL113 и WL131 не связываются с агглютинином люцерны и не прикрепляются к корневым волоскам люцерны; WL188 связывается с агглютинином и с корневыми волосками, но не индуцирует образование клубеньков. Также ведут себя полученные нами мутанты 1027 и 1126 в отношении связывания агглютинаина [18].

В предварительных опытах мы обнаружили, что pRmSL26 не комплементирует дефект этих штаммов. Поэтому мы перенесли в них посредством конъюгации банк клонов ДНК *R. meliloti* 102 в векторе pLAFR1 [12]. Отобрав эксконъюганты и смешав их группами по 200 колоний, мы инокулировали каждой смесью группы, состоящие из пяти выравненных проростков люцерны. Полученные результаты сведены в таблице 9.1.

9.1. Проверка банка клонов ДНК *R. meliloti* 1021

Мутант	Смесь	Число растений с клубеньками/общее число растений в группе	Мутант	Смесь	Число растений с клубеньками/общее число растений в группе
WL113	A	0/5	WL131	D	0/5
	B	2/5		E	0/5
	C	5/5	WL188	A	0/5
	D	3/5		B	0/5
	E	4/5		C	5/5
WL131	A	0/5	D	0/5	
	B	0/5	E	4/5	
	C	0/5			

Клубеньки растений групп 113D и 188E простерилизовали, раздавили и их содержимое рассеяли на неселективные среды. Устойчивые к тетрациклину колонии, содержащие плазмиды pLAFR1, были расчищены и вновь использованы для инокуляции проростков люцерны. Они оказались Nod⁺. Теперь анализируются плазмиды из этих штаммов. Нашей следующей целью будет вставка Tn5 в клонированные гены *R. meliloti* на этих плаزمидах и их повторная интеграция в геном *R. meliloti* методом Рувкуна и Аусюбеля [23], который позволяет их картировать.

Неясно, почему мутант WL131, фенотипически сходный с WL113, не комплементируется банком клонов. В настоящее время мы испытываем плазмиду, которая комплементирует WL113, чтобы выяснить, придает ли она способность штамму WL131 индуцировать образование клубеньков. Альтернативная стратегия будет заключаться в использовании банка клонов последовательностей ДНК дикого типа для комплементации только агглютинин-связывающей активности, чтобы непосредственно отбирать комплементированные мутанты по связыванию агглютинина. Все полученные клоны будут проверены на способность придавать мутантам pod⁻ фенотип.

ДРУГИЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ

Описанный здесь метод клонирования генов, ответственных за ранние стадии образования клубеньков, с помощью комплементации мутантов может применяться для изучения генов инвазии у бактериальных патогенов растений. Исследования такого рода будут сопряжены с теми же самыми ограничениями — конкуренцией мутанта с диким типом и доминированием нормального генного продукта при формировании фенотипа бактерий.

Еще одно возможное применение метода — прямое клонирование pod-генов *Rhizobium*, определяющих круг хозяев. Например, банк клонов ДНК одного из штаммов *Rhizobium* можно перенести посредством конъюгации в другой штамм *Rhizobium* с иным кругом хозяев, а смесь эксконъюгантов можно нанести на растение-хозяина, восприимчивого лишь к первому штамму. По способности индуцировать клубеньки можно отобрать бактерии, содержащие клонированные гены первого штамма, которые детерминируют круг хозяев.

Имеется несколько затруднений, с которыми сопряжено осуществление такой схемы экспериментов. Первое из них проистекает из факта, выявленного Джонстоном и др. [15] и Бейноном и др. [5] в опытах по передаче плазмид. Если ввести в одну клетку две природные плазмиды, определяющие разный круг хозяев, то зачастую окзывается, что она плохо индуцирует образование клубеньков у растений-хозяев и того, и другого круга. Следовательно, такие содержащие плазмиды клетки могут не обладать высокой конкурентоспособностью.

В этой связи возникает вопрос, не являются ли гены, ответственные за образование клубеньков, кодоминантными. Если эти гены кодируют ферменты, которые действуют на поверхность клеток *Rhizobium*, модифицируя ее, то у отдаленно родственных штаммов на поверхности клеток может отсутствовать соответствующий субстрат для модификации продуктами генов образования клубеньков «чужого» штамма. (Возможно также, что некоторые продукты генов, контролирующих образование клубеньков, не являются ферментами, а сходны с иммунологически активными белками, которые связываются со своими молекулами-мишенями, а не модифицируют их. Кодоминантность подобных продуктов может зависеть от способа сборки молекул на поверхности клеток.)

Приведенные соображения указывают на трудности, с которыми может быть сопряжено прямое клонирование генов, определяющих круг хозяев. Одно из возможных решений этой задачи может заключаться в использовании мутантов по образованию клубеньков второго штамма в качестве реципиентов, чтобы вносимые клонированные гены имели больше шансов проявляться фенотипически.

Эксперименты по комплементации мутаций через «видовые» границы также могут дать нам ключик к пониманию того, какие стадии процесса формирования клубеньков, если таковые имеются, являются общими для всех штаммов *Rhizobium*. В свою очередь, это поможет нам понять то общее, что позволяет разным бобовым растениям взаимодействовать с *Rhizobium*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетические методы исследования полезны при анализе ранних этапов процесса формирования клубеньков, который, по-видимому, является многоэтапным. Поверхности клеток *Rhizobium* и растений-хозяев не всегда проявляют специфичность взаимодействий, судя по данным, полученным с помощью существующих методов исследований. Возможно, что тонкие изменения активности генов способны оказывать влияние на такой ранний этап взаимодействия, как прикрепление бактерий к растению. Для *R. meliloti*, у которого трансмиссивность крупной «мегаплазмиды», ответственной за симбиоз, затруднена, желательна создание рекомбинантных плазмид, несущих гены, ответственные за образование клубеньков. Последние можно использовать для комплементации мутаций и изучения генетических эффектов в отношении круга хозяев, а также для изучения регуляции ранних этапов процесса формирования клубеньков. Мы сосредоточили внимание на двух мутантах *R. meliloti*, которые не вызывают скручивания корневых волосков растений и не индуцируют образование клубеньков. Гены, которые дополняют функции у этих мутантов, были изолированы в виде рекомбинантных плазмид с помощью космидного вектора с широким кругом хозяев. Мы установили, что часть последова-

тельностью ДНК, клонированных в составе этой плазмиды, экспрессируются у бактериоидов, и теперь осуществляем картирование генов симбиоза в клонированном участке.

Благодарности. Мы признательны А. Пау, У. Лепсу, У. Бриллю за предоставление нам штаммов WL113, WL131 и WL 188.

Мы хотели бы также выразить благодарность Анне Хирш, Кейт Уилсон, Дж. Джонсу, Б. Буйкема и Ф. Аусубелю за сообщение нам своих результатов до начала настоящего симпозиума.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha L, Kondorosi A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Bauer WD (1981) Infection of legumes by Rhizobia. *Annu Rev Plant Physiol* 32:407—449
3. Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB (1978) Transfer of the drugresistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* 276:633—634
4. Beringer JE, Brewin NJ, Johnston AWB (1980) The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity* 45:161—186
5. Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol* 120:421—429
6. Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWB (1980a) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120:413—420
7. Brewin NJ, Beringer JE, Buchanan-Wollaston AV, Hirsch PR (1980b) Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 116:261—270
8. Buchanan-Wollaston AV, Beringer JE, Brewin NJ, Hirsch PR, Johnston AWB (1981) Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Mol Gen Genet* 178:185—190
9. Buikema WJ, Long SR, Brown SE, Bos R van den, Earl C, Ausubel FM (1983) Cosmid cloning of a large region of symbiotic genes from the megaplasmid of *R. meliloti*. *J Mol Appl Genet* (in press)
10. Dazzo FB, Hubbell DH (1982) Control of root hair infection. In: Broughton W (ed) *Nitrogen fixation*, vol II: *Rhizobium*. University Press, Oxford, pp 275—309
11. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski D (1980) A broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *PNAS* 77:7347—7351
12. Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Phizobium* mutants. *Gene* 18:289—296
13. Hirsch A, Long SR, Bang M, Haskins N, Ausubel FM (1982) Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 151:411—419
14. Hooykaas PJJ, Brussel AAN van, Dulk-Ras H den, Slogetern GMS van, Schilperoot RA (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291:351—353
15. Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR, Beringer JE (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* 276:1635—1636
16. Long SR, Meade HM, Brown SE, Ausubel FM (1982) Transposon-induced symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti*. In: Panopoulos N (ed) *Genetic engineering in the plant sciences*. Praeger Press, New York, pp 129—143

17. Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM (1982) Isolation of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* using transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149:114—122
18. Paau AS, Leps WT, Brill WJ (1981) Agglutinin from alfalfa necessary for binding and nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Science* 213:1513—1514
19. Rolfe BG, Gresshoff PM (1980) *Rhizobium trifolii* mutant interactions during the establishment of nodulation in white clover. *Aust J Biol Sci* 33:491—504
20. Rolfe BG, Gresshoff PM, Shine J (1980) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Sci Lett* 19:277—284
21. Rolfe BG, Djordjevic M, Scott KF, Hughes JE, Jones J, Badenoch, J, Gresshoff PM, Cen Y, Dudman WF, Zurkowski W, Shie J (1981) Analysis of the nodule forming ability of fast-growing *Rhizobium* strains. In: Gibson AH, Newton WE (eds) *Current perspectives in nitrogen fixation*. Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, pp 142—145
22. Rosenberg C, Boistard P, Denarie J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
23. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289:85—88
24. Vincent JM (1980) Factors controlling the legume *Rhizobium* symbiosis. In: Newton WE and Orme-Johnson WH (eds) *Nitrogen fixation*, vol II. University Park Press, Baltimore, pp 103—129
25. Zurkowski W, Lorkiewicz Z (1979) Plasmid-mediated control of nodulation in *Rhizobium trifolii*. *Arch Microbiol* 123:195—201

10. ГЕНЫ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИИ АЗОТА
У RHIZOBIUM MELILOTIГ. ДИТТА*, Д. КОРБИН*, С. ЛЕОНГ*, Л. БАРАН** и
Д. ХЕЛИНСКИ*

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные бактерии рода *Rhizobium* обладают уникальной способностью инфицировать корни бобовых растений и индуцировать на них формирование азотфиксирующих клубеньков. Такая симбиотическая ассоциация имеет исключительно важное значение, поскольку представляет собой один из главных путей поступления атмосферного азота в биосферу. Огромный интерес к симбиозу *Rhizobium* с бобовыми определяется не только тем, что последние являются важным источником пищевого и кормового белка, но также и тем, что детальное понимание основ такого симбиоза может способствовать созданию новых типов взаимоотношений растений с бактериями. Перед нами стоит важная задача попытаться понять сложные молекулярные механизмы функционирования клубеньков. Идентификация генов растения и бактерии, играющих существенную роль в симбиозе, — первый шаг на пути к этой цели, и применение современных методов клонирования ДНК значительно ускорило обнаружение таких генов. Наша лаборатория внесла свой вклад в исследования такого рода, разработав для *Rhizobium* систему клонирования в плаزمиды с широким спектром хозяев и создав банк генов симбионта люцерны *R. meliloti* [10]. В данной статье мы суммируем результаты наших последних работ по использованию этого банка в изучении генов *Rhizobium*, играющих важную роль в таком симбиозе.

NIF-ГЕНЫ R. MELILOTI

Идентификация нитрогеназы

В качестве модельной системы азотфиксации широко изучали группу *nif*-генов *Klebsiella pneumoniae*; об организации и регуля-

* G. Ditta, D. Corbin, S. Leong, and D. R. Helinski, University of California, San Diego La Jolla, CA 92093, USA.

** Current Address: L. Barran, Chemical and Biological Research Institute, Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, Canada K1A0C6.

ции выражения этих генов известно достаточно много (см. один из последних обзоров [17]). В настоящее время достигнуты некоторые успехи и в понимании молекулярных процессов, лежащих в основе связывания азота в симбиозе ризобий с бобовыми. В нескольких лабораториях ведется работа по клонированию и исследованию структурных генов нитрогеназы *Rhizobium*, так как эти гены существенны для любого процесса биологической фиксации азота. Гены нитрогеназы всех азотфиксирующих организмов в высокой степени консервативны по последовательности ДНК [18], и клонированная ДНК *Klebsiella* может быть использована в качестве пробы для гибридизации с целью идентификации нитрогеназных последовательностей у *Rhizobium*. Мы воспользовались таким приемом, чтобы идентифицировать гены нитрогеназы в созданном ранее банке генов *R. meliloti* в векторе pRK290 с широким спектром хозяев [10]. Анализ фрагментов ДНК, окружающих и включающих нитрогеназные гены, показал, что в этой области группируются специфичные для симбиоза гены азотфиксации [8]. Мы описываем здесь всю эту область. Отрезок, состоящий примерно из 14 т. п. н. ДНК, содержащий главным образом существенные для симбиоза гены, включая гены нитрогеназы, граничит с каждой стороны с ДНК, несущественной для симбиоза размером не менее 10 т. п. н. Два промотора, расположенные в центре, контролируют транскрипцию этой области в противоположных ориентациях.

Транспозонный мутагенез

Была описана полезная методика создания транспозонных мутаций-вставок в избранных районах ДНК генома грамотрицательных бактерий [19]. В соответствии с этой методикой, названной «замещение маркера», транспозонные вставки получают в пределах избранного клонированного фрагмента ДНК, находящегося на плазмидном векторе с широким кругом хозяев в клетках *E. coli*. Положение такой вставки можно определить с помощью рестрикционного анализа. Клонированную ДНК вводят в клетки исходного хозяина и ведут отбор рекомбинантов, у которых геномный аллель дикого типа заменен на переносимый плазмидой аллель со встроенным транспозоном. На последнем этапе вводят вторую несовместимую плазмиду, чтобы устранить исходную. В конечном итоге получают в геноме транспозонную мутацию-вставку, которую можно выявить по ее фенотипическому проявлению.

Рисунок 10.1 иллюстрирует анализ нитрогеназной области *R. meliloti* 102F34 методом замещения маркера. Всего получено 69 Tn5-вставок в ризобиальной ДНК длиной 34 т. п. н. Tn5 — это транспозон размером 5,6 т. п. н., придающий устойчивость к канамицину и неомицину. Положение вставок в пределах ризобиального генома было проверено расщеплением суммарной ДНК из каждого мутанта подходящим рестриктирующим ферментом (*Bgl*II, *Hind*III или *Bam*HI) с последующим: 1) фракционированием фрагментов ДНК электрофорезом в агарозном геле; 2) перене-

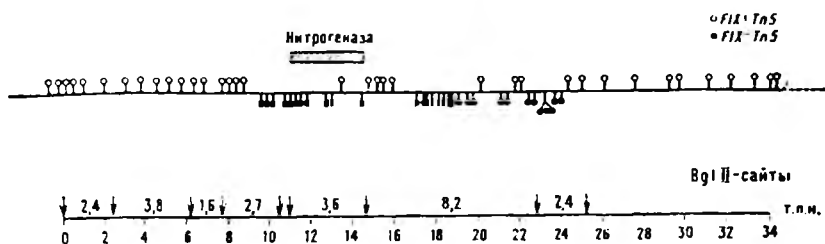


Рис. 10.1. Транспозонный анализ *nif*-области *R. meliloti*. Представлены генетические данные, показывающие приблизительные границы существенной для симбиоза ДНК *Rhizobium*, примыкающей к структурным генам нитрогеназы. Координатная шкала в единицах т. п. н. вместе с картой сайтов расщепления ферментом рестрикции *Bgl*III помещена в нижней части рисунка. Стрелками обозначены сайты расщепления *Bgl*III; указаны размеры фрагментов. Совокупность данных Tn5-транспозонного анализа с помощью замещения маркеров изображена в верхней части рисунка. Белые кружки соответствуют мутациям *Fix*⁺, черные кружки — *Fix*⁻, полужакрашенные кружки — *Fix*[±] (см. текст). Участок гомологии с *nifH*-геном *K. pneumoniae* показан в прямоугольнике точками (частично она может представлять также гомологию с *nifD*-геном); участок гомологии с геном *nifD* (возможно, и с *nifK*) *K. pneumoniae* показан в прямоугольнике штриховкой.

сом ДНК на нитроцеллюлозу по методу Саузерна [21] и 3) гибридизацией с радиоактивно меченной пробной *nif*-ДНК, не содержащей Tn5. В каждом случае мы наблюдали исчезновение определенного рестрикта с аллелем дикого типа и появление двух новых рестриктов, содержащих части Tn5. Симбиотический фенотип каждого инсерционного мутанта выявляли путем инокуляции проростков люцерны бактериальным штаммом с замещенным маркером и наблюдением за ростом растений и восстановлением ацетилена спустя 4—6 нед. Были обнаружены три класса вставок: 1) *Fix*⁺-вставки, которые не оказывали обнаружимого эффекта на рост растений или восстановление азота, т. е. не снижали эффективности клеток *R. meliloti* дикого типа; 2) *Fix*⁻-вставки, вызывающие полную неэффективность бактерий на люцерне, когда рост растений и восстановление ацетилена были такими же, как у неинокулированных контролей, и 3) три вставки *Fix*[±] в районе 23,4 т. п. н., вызывающие очень слабую позитивную ростовую реакцию (<5% от фенотипа *Fix*⁺) в отношении как роста растений, так и восстановления ацетилена. Эти три вставки картируются очень близко одна от другой (<100 п. н.), но тем не менее различимы. Все дефектные по симбиозу мутанты индуцировали небольшие белые клубеньки (т. е. были *Nod*⁺); это свидетельствует о том, что гены, контролирующие ранние стадии инфекции и формирование клубеньков, не локализованы в этой области.

Самые крайние *Fix*⁻-мутации на рисунке 10.1 отстоят друг от друга на 14,3 т. п. н. У *R. meliloti* 102F34 эта область явно представляет единый блок *nif*-генов, поскольку она граничит с обеих сторон с участками ДНК длиной не менее 10 т. п. н., несуществен-

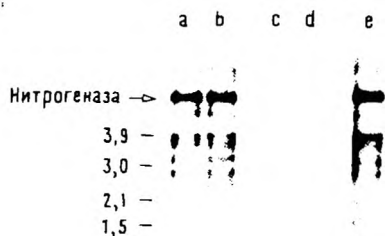
ными для симбиоза. Исследован также еще один участок ДНК в 10 т. п. н., расположенный правее того, который изображен на рисунке 10.1, он также не содержит последовательностей, необходимых для симбиоза.

Получен ряд Fix^+ -вставок, граничащих с каждой стороны с Fix^- -вставками. Если Tn5 -мутации оказывают строго полярный эффект на выражение генов *Rhizobium*, расположенных за ними по ходу транскрипции, то можно считать, что эти Fix^+ -вставки Tn5 указывают границы оперона. В клетках *E. coli* Tn5 -вставки строго полярны [3], хотя слабая транскрипция из транспозона наблюдалась примерно для одной трети вставок в области *lac* [4]. Мы тщательно проверили эффект Tn5 -вставок у нашего штамма *R. meliloti* и установили, что этот транспозон допускает поразительно высокий уровень транскрипции прилегающих к нему последовательностей ДНК. Такой анализ проведен с клонированным *HindIII* фрагментом 0,8 т. п. н., несущим структурный ген и предполагаемый сайт связывания рибосом для фермента хлорамфениколацетилтрансферазы (ХАТ) (Клоуз и Родригес, в печати). Этот фермент обуславливает устойчивость к антибиотику хлорамфениколу (ХМ). Поскольку промоторный участок для ХАТ на фрагменте отсутствует, выражение устойчивости к ХМ зависит от транскрипции с внешнего промотора. Когда фрагмент ХАТ был интегрирован в *HindIII*-сайт в координате 13,5 т. п. н. участка структурных генов нитрогеназы, проявляемый клетками уровень устойчивости к ХМ едва превышал фоновый (измеренный без фрагмента ХАТ). Это согласуется с тем фактом, что *nif*-гены *R. meliloti* не транскрибируются в условиях вегетативного роста [8]. Однако внедрение Tn5 в различные места перед геном ХАТ приводило к проявлению значительно более высокого уровня устойчивости к ХМ. Сходные данные получены для хорошо изученного гена синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты (δ -АЛКС) [13]; они показали, что Tn5 -вставки между δ -АЛКС-промотором и ХАТ-геном могут приводить к высоким уровням выражения гена ХАТ, следовательно, они не обязательно полярны. В настоящее время не ясно, влияет ли ориентация Tn5 на транскрипцию вне вставок, поскольку не все они в вышеописанных опытах обусловили одинаковый уровень устойчивости к ХМ. В целом уровень экспрессии ХАТ понижался при приближении вставки к промотору. Хотя описываемые опыты еще не завершены, ясно, что данных анализа транспозонных вставок будет недостаточно, чтобы сделать окончательные выводы о структуре оперона *nif*-области.

Изучение РНК

Много данных об организации и выражении существенных генов системы, находящейся в процессе развития, может дать прямой анализ набора синтезируемых РНК. Специфичная для клубеньков транскрипция последовательностей ДНК, включающих

Рис. 10.2. Блоттинг клубеньковой РНК *R. meliloti*. Дорожки *a, b* — суммарная РНК из 3- и 6-недельных клубеньков соответственно, гибридизована с меченым *Bgl*III-фрагментом ДНК 3,6 т. п. н. (рис. 10.1), несущим структурные гены нитрогеназы. Дорожки *c, d* — та же суммарная РНК, гибридизованная с меченым *Bgl*III-фрагментом ДНК 8,2 т. п. н. Дорожка *e* — контрольная, идентичная дорожке *a*, но без удаления из РНК следовых загрязнений молекулами ДНК. Цифрами слева от дорожки *a* отмечены положения рибосомной РНК, бактериальной и растительной, видимой в геле, окрашенном бромистым этидием. Размеры этих молекул РНК (в т. н.) предположительно те же, что и у *E. coli* и высших растений.



гены нитрогеназы, описана для *R. meliloti* [8] и *R. leguminosarum* [11]. С помощью РНК-блоттинга мы идентифицировали нитрогеназный транскрипт у *R. meliloti* (рис. 10.2, дорожки *a, b*); размеры его оказались значительно большими, чем у *R. leguminosarum* [12]. Мы выделяли суммарную РНК из 4—6-недельных клубеньков, удаляли следовые количества ДНК, разделяли РНК в денатурирующем формальдегидном геле, переносили РНК на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали РНК на фильтре с ник-транслированной ДНК, содержащей нитрогеназные гены. Для последней операции мы использовали *Bgl*III-фрагмент 3,6 т. п. н., имеющий координаты с 11,1 по 14,7 т. п. н., поскольку он содержит все последовательности, гомологичные клонированному участку генов нитрогеназы *K. pneumoniae* [8]. Отсутствие подходящих маркеров для РНК не позволяет точно определить ее размер, но на основании положения рибосомной РНК, присутствующей в образце, можно оценить размер транскрипта нитрогеназы *R. meliloti*, который составляет приблизительно 5,5—6,9 т. н.

Поскольку с помощью РНК-блоттинга не удалось однозначно идентифицировать РНК, гомологичную другим частям группы генов *nif* (рис. 10.2, дорожки *c, d*), мы применили иной подход для идентификации дополнительных *nif*-специфичных транскриптов. Индивидуальные двунитевые фрагменты ДНК радиоактивно метили по 5'- или 3'-концам, денатурировали и гибридизовали с суммарной РНК из клубеньков 4—6-недельных растений. Условия реакции гибридизации (температуру, концентрацию формамида) подбирали так, чтобы образование дуплекса РНК/ДНК преобладало над образованием дуплекса ДНК/ДНК. Негибридизованную ДНК после реакции гибридизации удаляли обработкой нуклеазой *S1* и «защищенную» ДНК анализировали электрофоретически в щелочном агарозном геле с последующей радиоавтографией. Этот метод, впервые описанный Берком и Шарпом [5], представляет собой относительно простой, но чувствительный способ обнаружения и картирования РНК-транскриптов со специфичных фрагментов ДНК. Если транскрипт начинается в пределах определенного фраг-

мента ДНК с меченым 5'-концом и продолжается дальше этого конца, то можно наблюдать меченый гибридный фрагмент, размер которого меньше, чем у негибридизованного фрагмента. Размер гибридного фрагмента позволяет устанавливать точное положение 5'-конца РНК относительно одного из 5'-концов фрагмента ДНК. Та же методика позволяет картировать 3'-конец отрезков РНК на фрагментах с меченым 3'-концом. Направление транскрипции можно определить, проводя перед гибридизацией асимметричное расщепление фрагмента ДНК рестриктирующим ферментом.

Подобный анализ был применен к разным фрагментам ДНК из *nif*-области *R. meliloti*, его результаты сведены на рисунке 10.3. К настоящему времени выявлены два направленные в противоположные стороны транскрипта (РНК 1 и РНК 2) с 5'-концами, отстоящими на 1,9 т. п. н. Либо ДНК между этими транскриптами в клубеньке не транскрибируется, либо стационарный уровень РНК, транскрибируемой с рассматриваемого участка, ничтожно мал по сравнению с РНК 1 и РНК 2. Это согласуется с результа-

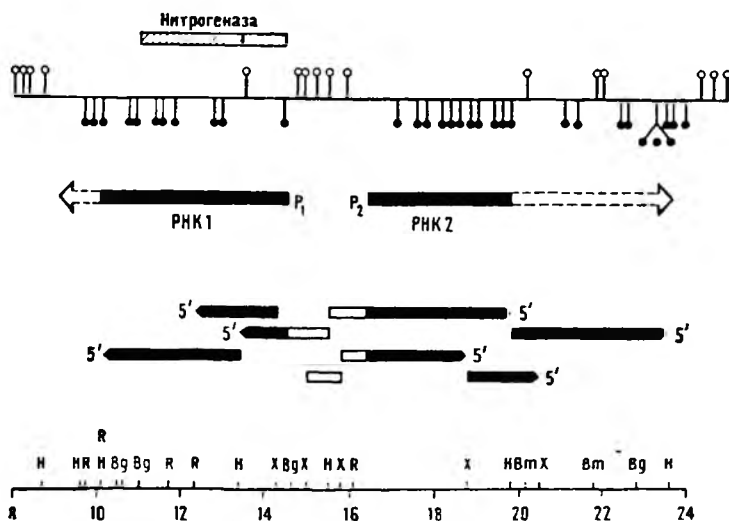


Рис. 10.3. S1-Картирование участка ДНК *R. meliloti*. Показаны фрагменты ДНК и схема мечения, использованная для определения транскриптов РНК 1 и РНК 2. В *верхней части* рисунка приведено увеличенное изображение части сегмента ДНК с данными по транспозонному анализу с рисунка 10.1; обозначения те же. Координатная шкала *внизу* та же, что и на рисунке 10.1. Здесь показана более полная рестрикционная карта:

Bg — BglII; R — EcoRI; H — HindIII; Bm — BamHI; X — XhoI. Жирные линии с 5'-концами соответствуют фрагментам ДНК, меченым по 5'-концам, которые были использованы при S1-картировании суммарной клубеньковой РНК. Зачернены — защищенные в результате гибридизации с РНК участки ДНК; незачернены — незащищенные участки ДНК. Заостренные концы указывают на полярность транскриптов относительно рестрикционной карты. Черные отрезки для РНК 1 и РНК 2 представляют минимальный размер транскриптов, определенный на основании приведенных данных. Пунктирные стрелки показывают направление транскрипции и положение, до которого она, вероятно, доходит. P₁ и P₂ — предполагаемые промоторные участки.

тами транспозонного анализа (рис. 10.1), следовательно, существенные для симбиоза гены здесь не содержатся.

РНК 1 покрывает участок, кодирующий структурные гены нитрогеназы. Существование крупного транскрипта на этом участке согласуется с данными РНК-блоттинга, представленными на рисунке 10.2, и с генетическими данными Рувкуна и др. [20]. Эти авторы показали, что транспозонные вставки в геноме слева от координаты 14,4 могут комплементироваться клонированной ДНК, включающей этот участок, если присутствуют также последовательности ДНК справа в *цис*-положении. ДНК последнего участка, видимо, включает предполагаемый промотор для РНК 1. Рувкун и др. [20] сообщили также о выделении двух, расположенных близко друг к другу транспозонных вставок около координаты 13,5, определяющих слабоположительные по симбиозу фенотипы. Предполагается, что они могут представлять собой межгенные вставки с неполной полярностью Tn5. Нами была получена одна Tn5-вставка в координате 13,5, которая приводит к совершенно нормальному по симбиозу фенотипу. Это согласуется с тем, что Tn5-мутации в нашем ризобиальном штамме могут быть неполярными. Все три перечисленные вставки, вероятно, затрагивают межгенный участок между *nifH* и *nifD*. Анализ последовательностей ДНК показывает, что конец структурного гена *nifH* лежит в 200 п. н. справа от *Hind*III-сайта в координате 13,5 [22].

Размер транскрипта РНК 1 (>5,5 т. н.) свидетельствует, что в нем могут быть закодированы существенные для симбиоза генные продукты (один или несколько), отличные от полипептидов нитрогеназы. Для последних у *K. pneumoniae* было бы достаточно кодирующей последовательности всего в 4,3 т. п. н., хорошо соответствующей размеру нитрогеназного транскрипта, описанного для *R. leguminosarum* [12]. У *K. pneumoniae* гены нитрогеназы *nifK*, *D* и *H* транскрибируются как часть оперона, включающего еще один ген *nifY*, который кодирует белок с молекулярной массой 24 000 Да. Очевидно, что на нитрогеназном транскрипте *R. meliloti* достаточно места для кодирования подобного белка.

Количество РНК 2 в наших экспериментах уступало таковому РНК 1. Транскрипт РНК 2 покрывает не менее 3,4 т. п. н. ДНК от координаты 16,4 до координаты 19,8 на рисунке 10.3. Мы наблюдали продолжение транскрипции РНК 2 еще на 3,8 т. н., по меньшей мере до координаты 23,6, так как фрагменты ДНК с координатами от 19,8 до 23,6 и от 18,8 до 20,5 (рис. 10.3) могут быть полностью защищены в опытах по S1-картированию. Пока не ясно, однако, насколько такая транскрипция существенна для выражения генов и какая ее часть обусловлена сквозным считыванием матрицы из-за неполной терминции. Поскольку с помощью РНК-блоттинга не удалось выявить специфичного транскрипта для этого участка (рис. 10.2), имеющийся на сегодняшний день данные следует толковать с осторожностью. Другие данные, полученные с использованием радиоактивно меченой суммарной РНК из клубеньков в качестве пробы, указывают на то, что транскрипция не

продолжается сколько-нибудь заметно дальше *Bgl*III-сайта рестрикции в координате 25,4 (рис. 10.1), что согласуется с результатами по транспозонным вставкам (данные не представлены). Не влияющие на симбиоз Tn5-вставки были получены в координатах 20,2, 21,9 и 22,0, а это свидетельствует о том, что они находятся в пределах межгенных участков или вблизи них. Пока еще не выяснены функции генных продуктов, кодируемых областью ДНК правее координаты 16,4.

Следует оценить значение и пределы применимости полученных данных. Области *nif* *R. meliloti* и *K. pneumoniae* характеризуются рядом общих черт. По определению, обе существенны для фиксации N₂. Обе выражаются лишь при определенных условиях и обе включают структурные гены нитрогеназы. Однако неизвестно, участвуют ли продукты остальных генов *nif*-области *R. meliloti*, помимо нитрогеназы, в биохимических реакциях азотфиксации в процессе симбиоза или каких-либо других специфических аспектах функционирования клубеньков. Максимальная кодирующая емкость одной цепи ДНК *nif*-области *R. meliloti*, как мы выяснили, составляет всего лишь около 13,8 т. н. (точнее, 15,7 т. н. всего участка по данным инсерционного анализа минус 1,9 т. н. промежутка между транскриптами РНК 1 и РНК 2). Это значительно меньше, чем почти 24 т. п. н., необходимых для размещения 17 тесно сцепленных *nif*-генов *Klebsiella* [6, 16]. Либо для фиксации азота у *R. meliloti* требуется меньше генов, либо еще предстоит дополнительно найти гены, специфичные для симбиоза. Альтернативная возможность заключается в том, что информационная емкость этой *nif*-области больше, чем мы предположили. Имеется много примеров перекрывающихся генов в других системах [2] и даже перекрывающихся сходящихся транскриптов [15]. Последние могут образовываться в меньшем количестве, чем РНК 1 и РНК 2, что затрудняет их обнаружение и локализацию.

Если созревание РНК не происходит, можно считать, что 5'-концы РНК 1 и РНК 2 представляют *nif*-промоторные участки *Rhizobium* (P₁ и P₂, рис. 10.3). Механизмы контроля, действующие на этих промоторах, имеют ключевое значение для симбиоза. Если РНК 1 и РНК 2 определенно являются функционально важными транскриптами *nif*-области зрелых бактериоидов, то мыслима и транскрипция с других, менее активных промоторов, особенно на ранних этапах формирования клубеньков. Следует тщательно исследовать этапы, ведущие к исходной активации *nif*-области у *R. meliloti*, либо создав систему активной транскрипции этой области *in vitro*, либо идя более трудным путем прямого наблюдения самых ранних этапов инициации клубеньков.

СИНТЕЗА δ -АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Процесс симбиотического связывания азота у *Rhizobium* тесно связан с биосинтезом гема. С одной стороны, гем — важный ком-

понент бактериальных цитохромов и играет непосредственную роль в дыхании бактероидов. С другой стороны, гем бактерий входит в состав леггемоглобина — специфичного для клубеньков гемопротенда, ответственного за регуляцию концентрации кислорода в клубеньках. По существующим оценкам, бактерии должны в 10—20 раз увеличивать синтез гема, необходимого для образования леггемоглобина [9]. В нашей лаборатории изучается регуляция биосинтеза гема при симбиозе, и мы клонировали структурный ген синтетазы δ -аминолевулиновой кислоты (САЛК) — первого фермента в цепи синтеза гема [13]. Этот фермент катализирует конденсацию глицина и сукцинилкоэнзима А при образовании δ -аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК) и считается главным пунктом контроля при биосинтезе гема у ряда организмов. У *R. japonicum* активность САЛК значительно возрастает как в ходе симбиоза [14], так и при вегетативном росте в условиях пониженной концентрации кислорода [1].

Первым шагом в клонировании гена САЛК было выделение и изучение мутанта с дефектным ферментом. Два таких мутанта были получены после мутагенеза *R. meliloti* 102F34 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином и массовой проверки выживших ауксотрофов по δ -АЛК при вегетативном росте. Оба они были также симбиотически дефектны в отсутствие экзогенной δ -АЛК. Затем эти мутанты комплементировали клонированными фрагментами ДНК, содержащимися в банке генов *R. meliloti*, и была идентифицирована одна гибридная плазмида, которая содержала аллель САЛК дикого типа. Эта плазмида, pRK290.790, показана на рисунке 10.4.

Локализация гена САЛК на плазмиде была осуществлена с помощью получения большого числа Tn5-вставок. Около 90 недостаточных по САЛК мутантов было идентифицировано и использовано для картирования границ гена длиной 1,5 т. п. н., содержащегося в самом крупном *Bgl*III-фрагменте ДНК. Точно опреде-

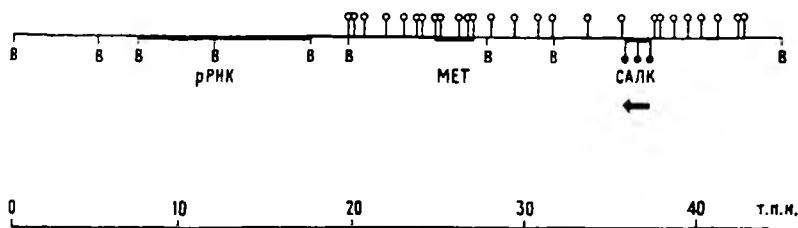


Рис. 10.4. Анализ генетического участка САЛК у *R. meliloti*. Участие последовательностей, окружающих участок САЛК, в синтезе анализировали Tn5-замещением маркеров. Белые кружки — Fix^+ -вставки, черные кружки — Fix^- . Стрелкой указано направление и границы транскрипции участка САЛК. MET — участок, детерминирующий прототрофность по метионину, pRНК — приблизительное местоположение участка гомологии с рибосомной РНК. Координатная шкала в единицах т. п. н. помещена в нижней части рисунка.

лены 5'- и 3'-концы транскрипта САЛК, свидетельствующие, что САЛК кодируется единым опероном длиной около 1,5 т. п. н., транскрибируемым в указанном на рисунке 10.4 стрелкой направлении.

Было показано, что рассматриваемый клонированный ген действительно является структурным геном САЛК, а не регуляторным геном, контролирующим биосинтез или активность этого фермента [13].

Как таковой он представляет всего лишь второй пример клонированного, существенного для симбиоза гена, который хорошо охарактеризован биохимически (первый пример — нитрогеназа). Сразу же возникает вопрос, имеются ли еще важные для симбиоза гены вблизи гена САЛК, в частности гены, вовлеченные в биосинтез гема.

Для ответа на этот вопрос с помощью методики замещения маркера мутагенизировали область, окружающую ген САЛК, транспозоном Tn5. Симбиотический фенотип созданных таким путем Tn5-мутантов указан на рисунке 10.4. За исключением мутантов, содержащих вставки непосредственно в гене САЛК, все штаммы с замещенным маркером эффективно связывали азот. Нами обнаружено несколько ауксотрофов по метионину, возникших в результате вставок Tn5 в участок длиной 2,7 т. п. н., с координатами от 24,7 до 27,4. РНК-блоттинг позволил выявить, что pRK290.790 содержит участки гомологии с 23S- и 16S-рибосомной РНК *Rhizobium*. Сопоставление клонов банка генов, которые эффективно гибридизуются с радиоактивно меченной суммарной РНК, показывает, что соответствующие гомологичные участки, вероятно, содержатся где-то в пределах двух *Bgl*III-фрагментов, между координатами 7,6 и 17,5.

В нашей лаборатории продолжается работа по выявлению особенностей регуляции выражения гена САЛК как при вегетативном росте бактерий, так и в симбиозе с растением. Как пример обычного гена основного метаболизма *Rhizobium*, играющего, однако, ключевую роль в процессе симбиоза, ген САЛК представляет интересный контрапункт в стремительно развивающихся исследованиях *nif*-области *Rhizobium*.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Гены нитрогеназы составляют часть большой области существенных для симбиоза генов фиксации азота (*nif*) у *R. meliloti*. Область *nif* занимает 14—16 т. п. н. ДНК *Rhizobium*; транскрипция с двух расположенных в ее центре промоторов идет в противоположные стороны. Ранее было установлено, что транскрипция области *nif* специфична для состояния симбиоза. Еще один существенный для симбиоза ген, кодирующий синтетазу δ-аминолевулиновой кислоты (САЛК), представляет собой первый ген пути биосинтеза гема. Однако в отличие от продуктов *nif*-области,

САЛК необходима и для нормального вегетативного роста *Rhizobium*.

Участок САЛК организован в виде единого оперона и тесно сцеплен с генами рибосомной РНК и с геном пути биосинтеза метионина.

Вблизи области САЛК не обнаруживается существенных для симбиоза функций. Знание организации и выражения важных для симбиоза генов необходимо для управления симбиозом *Rhizobium* с бобовыми растениями, что позволит создать новую технологию повышения продуктивности сельского хозяйства.

Благодарности. Мы признательны за превосходную техническую помощь М. Яновски и П. Тукер. Данная работа субсидировалась Национальным научным фондом. Салли Леонг является стипендиатом Национального института здравоохранения (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Avissar YJ, Nadler KD (1978) Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum* by restricted aeration. *J Bacteriol* 135:782—790
2. Barrell BG, Air GM, Hutchinson CA (1976) Overlapping genes in bacteriophage λ 174. *Nature* 264:33—41
3. Berg DE (1977) Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5. In: Bukhari AL, Shapiro JA, Adhya SL (eds) DNA insertion elements, plasmids, and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p 205
4. Berg DE, Weiss A, Crossland L (1980) Polarity of Tn5 mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 142:439—446
5. Berk AJ, Sharp PA (1977) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 12:721—732
6. Cannon FC, Riedel GE, Ausubel FM (1979) Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized. *Mol Gen Genet* 174:59—66
7. Close T, Rodriguez R (submitted)
8. Corbin D, Ditta G, Helinski DR (1982) Clustering of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 149:221—228
9. Dilworth MJ, Appleby CA (1979) Leghemoglobin and *Rhizobium* hemoproteins. In: Hardy RWF, Bottomley F, Burns RC (eds) A treatise on dinitrogen fixation, sect. I and II. John Wiley, New York, p 691
10. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7347—7351
11. Krol AJM, Hontelez JFJ, Bos RC Van den, Kammeu A Van (1980) Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res* 8:4337—4347
12. Krol AJM, Hontelez JGJ, Roozendaal B, Kammen A Van (1982) On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. *Nucleic Acids Res* 14:4147—4157
13. Leong SA, Ditta GS, Helinski DR (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for δ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* 257:8724—8730
14. Nadler KD, Avissar YJ (1977) Heme biosynthesis in soybean root nodules. I. On the role of bacteroid δ -aminolevulinic acid synthetase and δ -aminolevulinic acid dehydrase in the synthesis of the heme of leghemoglobin. *Plant Physiol* 60:433—436

15. Rak B, Lusky M, Hable M (1982) Expression of two proteins from overlapping and oppositely oriented genes on transposable DNA insertion element IS5. *Nature* 297:124—128
16. Riedel GE, Ausubel FM, Cannon FC (1979) Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl Acad Sci USA* 76:2866—2870
17. Roberts GP, Brill WJ (1981) Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Annu Rev Microbiol* 35:207—235
18. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
19. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289:85—88
20. Ruvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559
21. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503—517
22. Török I, Kondorosi A (1981) Nucleotide sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. *Nucleic Acids Res* 9:5711—5723

11. ВЕКТОРНЫЕ ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ IN VIVO И IN VITRO

С. СИМОН, У. ПРИФЕР, А. ПЮЛЕР*

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес исследователей к молекулярной генетике грамотрицательных бактерий, отличных от *E. coli*, особенно почвенных бактерий, проявляющих такие важные биологические свойства, как фиксация азота или индукция болезней растений. До недавнего времени современные методы исследований, такие, как транспозонный мутагенез и молекулярное клонирование генов, использовались в экспериментах с *E. coli* и близкородственными организмами. Однако теперь такие методы применяются для изучения многих других грамотрицательных бактерий: сконструированы специальные плазмиды, позволяющие вводить транспозоны в бактериальные клетки различных родов [4, 15], а также векторы для клонирования, которые поддерживаются в клетках широкого круга грамотрицательных бактерий [1, 2, 3, 7].

В настоящей статье мы описываем создание и использование некоторых новых векторных плазмид, обеспечивающих транспозонный мутагенез *in vivo*, а также мобилизацию криптоических, не способных к автономной передаче плазмид. Мы также приводим описание новых клонирующих векторов, сочетающих достоинства векторов из *E. coli* с функциями мобилизуемости и репликации в широком круге хозяев, свойственные IncQ/P-плазмиде RSF1010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система мобилизации

Конструирование мобилизуемых векторных плазмид

Обычные векторные плазмиды *E. coli*, такие, как pBR325 [5] или pACYC184 [6], не являются ни автотрансмиссивными, ни эффективно мобилизуемыми.

Чтобы придать этим многоцелевым векторным плазмидам способность к мобилизации, мы встраивали небольшие рестриктон-

* S. Simon, U. Priefer, and A. Pühler, Lehrstuhl für Genetik, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, 4800 Bielefeld, BRD.

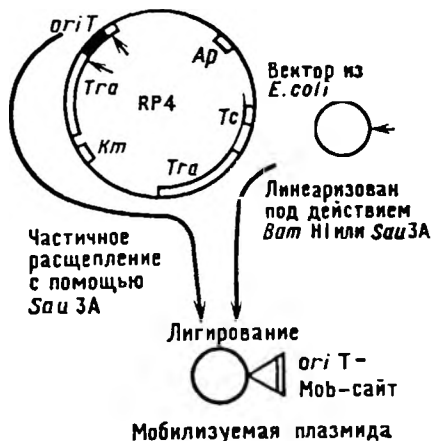


Рис. 11.1. Конструирование мобилизуемых векторных плазмид. ДНК RP4 была частично расщеплена нуклеазой *Sau3A*, а нужный вектор из *E. coli* линсаризован нуклеазой *Bam*HI или очень мягкой обработкой *Sau3A*. После лигирования и трансформации получившиеся в результате плазмиды были подвергнуты массовой проверке на способность к мобилизации. *OriT* обозначает точку начала репликации при переносе, картированную в пределах участка *Trg* [10].

ные фрагменты плазмиды RP4 с широким спектром хозяев в линсаризованную ДНК вектора. Схема клонирования представлена на рисунке 11.1. Получившиеся в результате мобилизуемые гибридные плазмиды несут клонированный фрагмент ДНК, предположительно содержащий участок *oriT*, который дает возможность векторной плазмиде эффективно переноситься в присутствии RP4. Поскольку мы полагаем, что этот участок ДНК узнается в *транс*-положении функцией переноса конъюгативных IncP-плазмид, эта последовательность ДНК названа Моб-сайтом. В опытах по скрещиванию между штаммами *E. coli* частота, с которой RP4 мобилизует векторы, содержащие Моб-сайт, равна почти 100%. Однако для большинства случаев вместо мобилизующей плазмиды RP4, нежелательной в некоторых опытах, мы сконструировали специальные донорные штаммы *E. coli*, которые несут производные RP4, интегрированные в их хромосому.

Мобилизующие штаммы

Если две разные производные RP4 принудительно сосуществуют в дефектном по гену *recA* штамме *E. coli*, то при совместном селективном давлении клетки растут плохо. В редких случаях можно изолировать нормально растущие колонии, и некоторые из них содержат одну из двух несовместимых производных RP4, интегрированную в хромосому (Р. Симон, *неопубликованное наблюдение*). Мы воспользовались такими отношениями несовместимости, чтобы заставить RP4-плазмиды включиться в хромосому штаммов *E. coli*. В таблице 11.1 приведены свойства полученных штаммов. Гены переноса интегрированных производных RP4 все еще могут выражаться, и их можно использовать в конъюгационных экспериментах по мобилизации векторных плазмид, несущих специфичный для RP4 Моб-сайт. Мы называем такой тип донора мобилизующим штаммом. Такие штаммы обладают важным преимуществом, заключающимся в том, что мобилизующая плазмид

11.1. Мобилизующие штаммы

Штамм	Интегрированная плаزمида	Маркеры устойчивости		Другие важные свойства
		в RP4	в хромосоме	
S68-7	RP4-2 (Tc::Mu)	Km	Sm	Thi, Pro, His, su ⁻
SM10	RP4-2 (Tc::Mu)	Km	—	Thi, Thr, Leu, su ^{III}
S17-1	RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)	Tr-Sm	—	Pro, res ⁻ , mod ⁺

Примечание. Перечисленные в таблице донорные штаммы *E. coli* дефектны по гену *recA*. S68-7 ведет свое происхождение от штамма CSH52, SM10—от C600 и S17-1—от *E. coli* 294. Интегрированные в хромосому производные RP4 происходят от RP4-2. Эта плазмида имеет делецию в транспозоне Tn1, обуславливающую Ар-чувствительность; ее Tc-устойчивость была инактивирована вставкой фага Mu (Tc::Mu), а у S17-1 Km-устойчивость была снята вставкой Tn7 (Km::Tn7).

(например, RP4) не переносится в реципиент, в то время как частота передачи мобилизуемой векторной плазмиды такая же, как у RP4 дикого типа.

Векторные плазмиды класса I

К векторам класса I мы относим плазмиды, несущие RP4-специфичный Mob-сайт и реплицирующиеся только в *E. coli*. Эти векторы построены на основе следующих репликонов: pACYC184, pACYC177 и pBR325. Mob-Сайт был интегрирован в них, как схематически показано на рисунке 11.1. На рисунке 11.2 изображены генетические и физические карты сконструированных к настоящему времени векторов класса I. Поскольку векторы класса I созданы на основе специфичных репликонов *E. coli* с узким кругом хозяев, они не способны реплицироваться в бактериях, которые не относятся к близким родственникам *E. coli*. Однако поскольку для мобилизации этих векторов использованы функции RP4 по переносу в широкий круг хозяев, то должно оказаться возможным внести их в любую грамотрицательную бактерию, способную быть реципиентом для конъюгационного переноса RP4. Поэтому векторные плазмиды класса I наиболее пригодны для транспозонного мутагенеза многих грамотрицательных бактерий, таких, например, как Rhizobiacea или другие почвенные бактерии. Полезность векторов класса I для транспозонного мутагенеза штаммов, отличных от *E. coli*, демонстрируется следующим экспериментом. Плазмида pSUP2021 является мобилизуемым производным pBR325, несущим транспозон Tn5 с устойчивостью к Nm (рис. 11.3, a). Был осуществлен ее перенос из мобилизующего штамма S17-1 в *R. meliloti* 2011 (Sm^r). Скрещивание осуществлялось с использованием мембранных фильтров на обогащенной среде в течение 5 ч при 32 °C. Затем клетки суспендировали в стерильной воде и высевали на селективную среду, содержащую 500 мг/л Sm и 100 мг/л Nm.

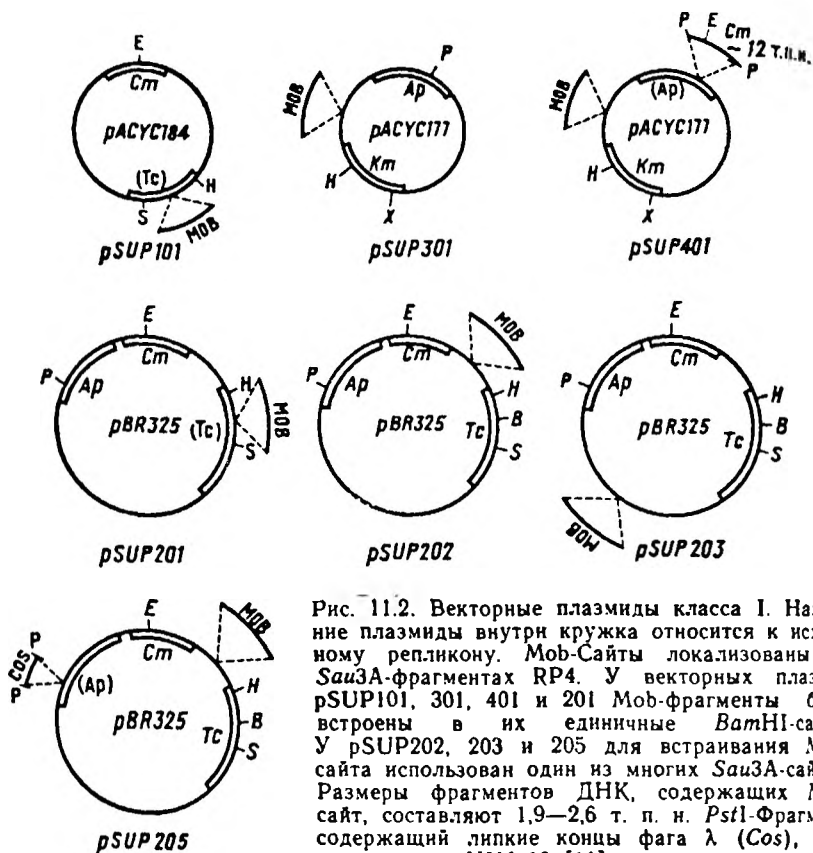


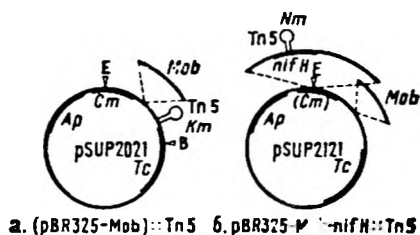
Рис. 11.2. Векторные плазмиды класса I. Название плазмиды внутри кружка относится к исходному репликону. Mob-сайты локализованы на *Sau3A*-фрагментах RP4. У векторных плазмид pSUP101, 301, 401 и 201 Mob-фрагменты были встроены в их единичные *Bam*HI-сайты. У pSUP202, 203 и 205 для встраивания Mob-сайта использован один из многих *Sau3A*-сайтов. Размеры фрагментов ДНК, содержащих Mob-сайт, составляют 1,9—2,6 т. п. н. *Pst*I-фрагмент, содержащий липкие концы фага λ (*Cos*), взят из плазмиды MUA-10 [11].

*Pst*I-фрагмент, определяющий Cm-устойчивость у pSUP401, ведет происхождение от фага P1Cmts (В. Клипп, неопубликовано):

Ap — устойчивость к ампициллину; Km — устойчивость к канамицину; Tc — устойчивость к тетрациклину; Cm — устойчивость к хлорамфениколу;
 E — *Eco*RI; B — *Bam*HI; H — *Hind*III; P — *Pst*I; S — *Sal*I; X — *Xho*I.

Nm^r-Трансконъюганты появлялись с частотой 10^{-5} на реципиент. Около 1—2 % этих, содержащих Tn5, клонов были ауксотрофными мутантами, т. е. данная система позволяет выделять мутанты, индуцированные транспозоном. Векторные плазмиды класса I можно также использовать для сайт-специфичного транспозонного мутагенеза, как показано в следующем модельном эксперименте. Фрагмент ДНК из *R. meliloti*, содержащий *nifH*-ген [12], был включен в мобилизуемый вектор pSUP2121 (рис. 11.3, б), а затем был мобилизован из штамма S17-1 в *R. meliloti* 2011 — штамм из которого был исходно получен ген *nifH*. При отборе на Nm^r-устойчивость (т. е. на внедрение Tn5 в геном реципиента) появились соответствующие трансконъюганты с частотой около 10^{-3} , что примерно в 100 раз превышает частоту таких трансконъюгантов

Рис. 11.3, а, б. Векторные плазмиды класса I, использованные для Tn5-мутagenеза; а — рSUP2021 — это рSUP202 (см. рис. 11.2), но несущая Nm-устойчивый транспозон Tn5; б — рSUP2121 также ведет происхождение от рSUP202. Фрагмент ДНК, несущий *nifH*-ген *R. meliloti*, встроен в единственный *EcoRI*-сайт; *nifH*-ген был мутагенизирован вставкой Tn5.



появлявшихся в опыте по неспецифичной транспозиции Tn5 с использованием рSUP2021 (см. выше). Подобное возрастание частоты свидетельствует о том, что во втором эксперименте произошла гомологичная рекомбинация между участком *nif*-ДНК дикого типа реципиента и Tn5-мутагенизированной *nif*-последовательностью, представленной в рSUP2121.

На присутствие маркеров устойчивости (Ap, Tc) вектора было проверено несколько сотен Nm^r-трансконъюгантов. Большинство клонов были Ap^r и Tc^r, что можно объяснить единичными рекомбинационными событиями, приводящими к интеграции в хромосому целой векторной плазмиды. Обмен последовательностями ДНК между переносимым плазмидой тандемом *nifH*::Tn5 и *nif* дикого типа в хозяине требует двойного кроссинговера и опознается по чувствительности к ампициллину и тетрациклину Nm^r-трансконъюгантов (ввиду потери векторной плазмиды). Подобный процесс, называемый гомогенотизацией, происходил примерно у 2% Tn5-содержащих трансконъюгантов. Десять клонов Nm^r Tc^s Ap^s испытаны в опытах по инокуляции растений. У всех из них проявился ожидаемый фенотип Nif⁻.

Векторные плазмиды класса I^r

Мы относим к векторам класса II плазмиды, мобилизуемые плазмидами IncP и способные реплицироваться в широком круге грамотрицательных бактерий. Мы объединили полезные свойства векторных плазмид *E. coli* (т. е. маркеры устойчивости к антибиотикам и сайты для клонирования) со способностью к мобилизации и репликации плазмиды с широким спектром хозяев RSF1010 [9]. Исходными векторами из *E. coli* вновь были рACYC184, рACYC177 и рBR325, тогда как функции репликации и мобилизации были взяты от рKT210, устойчивой к хлорамфениколу производной плазмиды RSF1010 [1]. Стратегия клонирования была следующей: ДНК векторов из *E. coli* была обработана ферментом рестрикции *Sau3A*, узнающим последовательность из четырех оснований, в очень низкой концентрации так, чтобы на каждую молекулу в среднем был внесен один разрыв. Такая линейризованная векторная ДНК была лигирована с ДНК рKT210, частично расщепленной рестриктазой *Sau3A*, и этой смесью трансформировали моби-

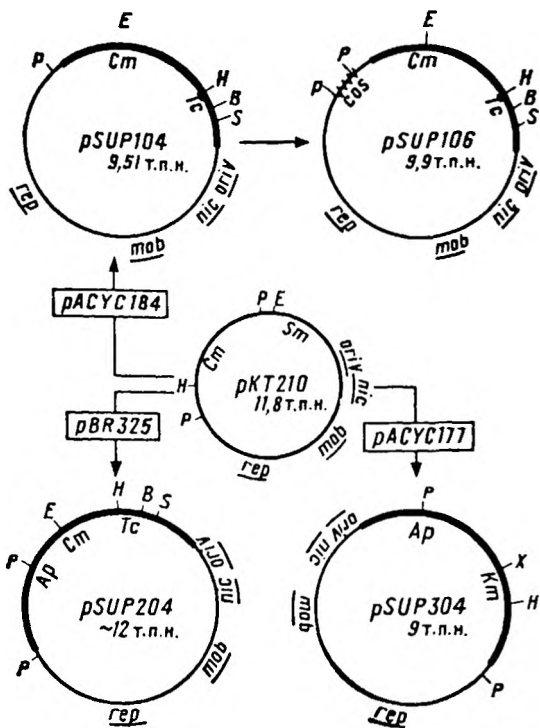


Рис. 11.4. Векторные плазмиды класса II. Векторные плазмиды pSUP204 и pSUP304 были сконструированы путем встраивания pKT210, кодирующей функции репликации и мобилизации, в pACYC184, pBR325 и pACYC177 соответственно (жирные линии). Плазмида pSUP106 получена из pSUP104 в результате вставки λ -Cos-участка плазмиды MUA-10 [11] в единственный PstI-сайт.

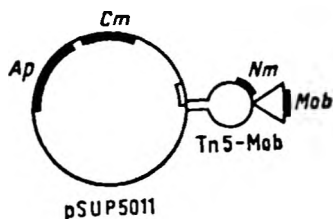
Cm, Tc, Ap, Km, Sm — гены устойчивости к хлорамфениколу, тетрациклину, ампициллину, канамицину и стрептомицину соответственно; E, H, B, S, P, X — сайты ферментов рестрикции EcoRI, HindIII, BamHI, Sall, PstI и XhoI соответственно; oriV — точка начала вегетативной репликации; rep — функция (функции) репликации; oriT — начало репликационного переноса (oriT); mob — функция (функции) мобилизации.

лизующий штамм S17-1. Затем всю сумму трансформированных бактерий скрестили с реципиентом *R. meliloti*, ведя отбор по одному из локализованных на векторе маркеров устойчивости. Такой отбор привел к изоляции трансконъюгантов, получивших производное вектора со свойствами репликации и мобилизации в широком круге хозяев RSF1010. На рисунке 11.4 показаны генетические и физические карты сконструированных векторов класса II. Они способны мобилизоваться из донорных клеток *E. coli* с высокой частотой и поддерживаются в ряде грамотрицательных бактерий, таких, как *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii* и *Agrobacterium tumefaciens*. Другие хозяева пока не испытывались, но мы полагаем, что наши векторы класса II сохраняют признак широкого круга хозяев RSF1010.

Конструирование и использование транспозона Tn5-Mob

Генетический анализ многих плазмид затруднен или вообще невозможен из-за отсутствия у них пригодных для отбора маркеров; к тому же они во многих случаях дефектны по способности к переносу. Это особенно справедливо для некоторых симбиотиче-

Рис. 11.5. Вектор класса I, несущий транспозон Tn5-Mob. pSUP5011 построена на основе репликона pBR325. Получена делеция, удалившая часть гена Tc-устойчивости, включая BamHI-сайт. Tn5 был встроен в месте, указанном на рисунке, а Mob-сайт — в единственный BamHI-сайт транспозона Tn5.



ских плазмид у *Rhizobium*, анализ которых представляет большой интерес. Одним из ранее разработанных способов генетического переноса было создание коинтегратов с участием плазмид Р-типа, например R68.45 [14]. Мы создали систему, придающую этим плазмидам не только маркеры, пригодные для отбора, но и способность к мобилизации. Идея заключалась во внедрении Mob-сайта RP4 в транспозон Tn5, так что и Nm-устойчивость, и мобилизуемость могли транслоцироваться транспозоном Tn5. Она была осуществлена путем встраивания RP4-специфичного Mob-сайта в единственный BamHI-сайт Tn5 (принципиально та же стратегия, что и показанная на рис. 11.1). Мы назвали этот транспозон Tn5-Mob. Nm-Устойчивость Tn5-Mob сохранилась от Tn5, как и способность к транспозиции. Следовательно, Mob-вставка не затронула указанные свойства.

Плазмида pSUP5011, нагруженная Tn5-Mob, показана на рисунке 11.5. Она принадлежит к семейству векторов класса I и потому может использоваться для проведения транспозонного мутагенеза. Чтобы продемонстрировать применение Tn5-Mob, мы опишем здесь мобилизацию мегаплазмиды из *R. meliloti*. Штамм *R. meliloti* 2011 был мутагенизирован транспозоном Tn5-Mob. Мы изолировали 20 Nm^r-трансконъюгантов, содержащих Tn5-Mob в неизвестных местах, и ввели в них плазмиду RP4-4 (Nm-чувствительная производная RP4) посредством конъюгации. Такие клоны скрестили затем с *A. tumefaciens* и отобрали Nm^r-трансконъюганты. Семь клонов обнаружили значительную способность к переносу Nm-устойчивости (с частотой 10^{-6} — 10^{-7} на донор). На основании этих данных мы пришли к выводу, что у рассматриваемых клонов Tn5-Mob транспонировался на мегаплазмиду, которая вслед за тем мобилизовалась под воздействием сосуществующей плазмиды RP4-4. Это было подтверждено анализом плазмид, содержащихся в клетках Nm^r-трансконъюгантов *A. tumefaciens*. У всех них прослеживалась дополнительная плазмида, соответствующая мегаплазмиде донора, *R. meliloti* 2011 (рис. 11.6). Эта мегаплазмида *R. meliloti* стабильно поддерживалась в клонах *A. tumefaciens*, которые одновременно приобрели способность индуцировать образование клубеньков у растений люцерны, однако они были неэффективны в отношении фиксации азота атмосферы.

Мобилизуя перенос мегаплазмиды *R. meliloti* в *A. tumefaciens* с помощью транспозона Tn5-Mob, нам удалось показать генетиче-

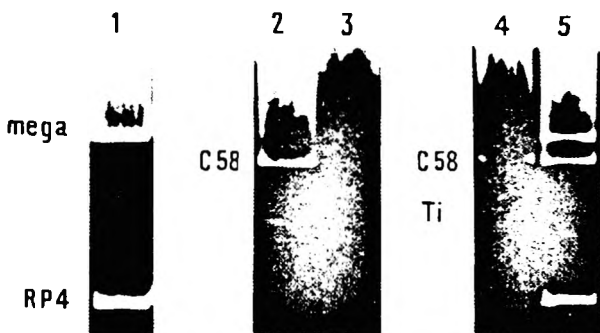


Рис. 11.6. Мобилизация мегаплазмиды *R. meliloti* в *A. tumefaciens*. Клетки деляли по модифицированной методике Экхарда [8]. ДНК анализировали на 0,8 %-ном агарозном геле в трис-боратном буфере в течение 3 ч при напряжении 120 В, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете:

1 — донор *R. meliloti* 2011. Он несет RP4-4 и Tn5-Mob, встроенные в мегаплазмиду; 2 — реципиент *A. tumefaciens* LBA290 (штамм, свободный от Ti-плазмиды); 3 — Npt-устойчивый трансконъюгант от скрещивания между донором *R. meliloti* и *A. tumefaciens* LBA290; 4 — реципиент *A. tumefaciens* LBA275, несущий Ti-плазмиду и криптическую плазмиду C58; 5 — Npt-устойчивый трансконъюгант от скрещивания между донором *R. meliloti* и *A. tumefaciens* LBA275.

ски, что по крайней мере гены, ответственные за специфичность в отношении хозяина и узнавание, а также за ранние этапы образования клубеньков, локализованы на мегаплазмиде и экспрессируются в клетках *A. tumefaciens*.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В настоящей статье мы описали потенциальные возможности некоторых новых векторных плазмид, созданных в качестве инструментов для осуществления генетических манипуляций *in vivo* с грамотрицательными бактериями, не родственными *E. coli*. Исходной идеей было придание обычным векторам *E. coli* последовательности ДНК (Mob-сайта), облегчающей их мобилизацию грамотрицательными бактериями многих родов плазмидой RP4. На этой основе мы сконструировали два класса векторных плазмид. Векторы класса I реплицируются только в клетках *E. coli*, тогда как плазмиды класса II переносятся и поддерживаются в клетках других бактерий. Векторы класса I пригодны для внесения транспозонов в клетки многих хозяев. Здесь мы обсудили неспецифичный Tn5-мутагенез *R. meliloti*. Но подобная методология применима как для других транспозонов, так и для других бактерий. Чтобы продемонстрировать применение векторов класса I в экспериментах по сайт-специфичному транспозонному мутагенезу, мы описали выделение мутантов *nifH::Tn5* *R. meliloti*. Подобные эксперименты по замещению генов, по-видимому, осуществимы

многими другими клонированными фрагментами ДНК из широкого круга грамотрицательных бактерий. Главные преимущества векторов класса I в сравнении с системой плазмиды pRK290 [13] таковы: они являются мультикопийными плазмидами, у них имеется больше сайтов для клонирования, и опыты по гомогенизации можно осуществить быстрее (для них требуется лишь одно бактериальное скрещивание). Векторы класса II также можно легко мобилизовать из *E. coli* во многие другие бактерии. Они обладают свойством реплицироваться в широком круге хозяев. Это позволяет проводить генетический анализ (например, опыты по комплементации) клонированных фрагментов ДНК различного происхождения в исходном или во многих других организмах-хозяевах.

Наконец, транспозон Tn5-Mob, описанный в данной статье, будет чрезвычайно полезен для мобилизации неавтотрансмиссивных плазмид. Мы продемонстрировали мечение мегаплазмиды *R. meliloti* транспозоном Tn5-Mob и последующую мобилизацию ее переноса в другие штаммы. И вновь система Tn5-Mob, вероятно, также может облегчить генетический анализ многих других репликонов (включая хромосому), когда предпочтителен метод конъюгационного переноса.

Благодарности. Мы хотели бы поблагодарить К. Ауфдерхайде за техническую помощь, А. Шульте за помощь при фотографировании, С. Мальмиваара за машинописную обработку рукописи и М. Лабес, одну из наших студенток, за содействие в конструировании штамма SM10. Мы признательны В. Кришнапиллаи за помощь, оказанную нам при подготовке рукописи. Работа субсидировалась Немецким научно-исследовательским объединением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Coleman S, Timmis KN (1979) New vector plasmids for cloning in *Pseudomonas*. In: Timmis KN, Pühler A (eds) *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, pp 411—422
2. Bagdasarian M, Lurz R, Rückert B, Franklin FCH, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16:237—247
3. Bagdasarian M, Lurz R, Nordheim A, Frey J, Timmis KN (1982) Molecular and functional analysis of the broad host range Sm-Su plasmid RSF1010, and construction of derivative vectors for gene cloning in Gram-negative bacteria. In: Mitsuhashi S (ed) *Microbial drug resistance. Proc 3rd Int Symp*, Tokyo
4. Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB (1978) Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* 276:633—634
5. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa J, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multi-purpose cloning system. *Gene* 2:95—113
6. Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134:1141—1156

7. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 77:7347
8. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584—588
9. Guerry P, Embden J Van, Falkow S (1974) Molecular nature of two non-conjugative plasmids carrying drug resistance genes. J Bacteriol 117:619—627
10. Guiney DC, Helinski DR (1979) The DNA-protein relaxation complex of the plasmid RK2: Location of the site-specific nick in the region of the proposed origin of transfer. Mol Gen Genet 176:183—189
11. Meyerowitz EM, Guild GM, Prestidge LS, Hogness DS (1980) A new cosmid vector and its use. Gene 11:271—282
12. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc Natl Acad Sci USA 77:191—195
13. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature 289:85
14. Scott DB, Ronson CW (1982) Identification and mobilization by cointegration of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. J Bacteriol 151:36—43
15. Vliet F Van, Silva B, Montagu M Van, Schell J (1978) Transfer of RP4-like plasmids to *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid 1:446—455

12. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ pRL1J1 — СИМБИОТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМИДЫ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM

ДЖ. ДАУНИ, Г. ХОМБРЕХЕР, К.-С. МА, С. НАЙТ
и А. ДЖОНСТОН *

ВВЕДЕНИЕ

Твердо установлено, что гены, детерминирующие у *Rhizobium* образование клубеньков и фиксацию азота, локализованы на крупных плаزمидах этих бактерий. Это справедливо по крайней мере для таких быстрорастущих видов, как *R. leguminosarum* и *R. phaseoli* (см., например, [12]), *R. trifolii* [13] и *R. meliloti* [1, 20]. В настоящей статье мы приводим описание некоторых свойств плазмиды pRL1J1 *R. leguminosarum*, исходно обнаруженной при обследовании полевых изолятов этого вида *Rhizobium* на способность продуцировать бактериоцин. Один из изолятов (штамм 248) синтезировал полипептид бактериоцина; это свойство с высокой частотой (1%) передавалось посредством конъюгации штаммам *R. leguminosarum*, *R. trifolii* и *R. phaseoli* [10]. Анализ бактериоциногенных трансконъюгантов в агарозных гелях позволил выявить наличие у них добавочной плазмидной полосы, размер которой был оценен в 220 т. п. н. [11]. Эта бактериоциногенная плаزمида получила наименование pRL1J1.

При переносе pRL1J1 в мутантные клетки, не индуцирующие клубеньки (Nod⁻), и в некоторые не фиксирующие азот мутантные клетки (Fix⁻) *R. leguminosarum* трансконъюганты обладали способностью индуцировать клубеньки у гороха и связывать азот [4, 14]. Кроме того, когда производную pRL1J1, содержащую транспозон Tn5, переносили в штаммы *R. trifolii* или *R. phaseoli*, трансконъюганты индуцировали образование клубеньков у гороха [3, 14]. Установлено также, что pSA30 (плазмида, несущая структурные гены нитрогеназы *K. pneumoniae* [8]) гибридизуется с pRL1J1, следовательно, последняя несет *nif*-гены [12].

Бьюкенен-Уолластон и др. [6] изолировали несколько дефектных по симбиозу мутантов, интегрируя Tn5 в pRL1J1. В настоящей работе мы приводим дальнейшее описание мутаций Fix⁻ и Nod⁻ в pRL1J1 и их свойств.

* J. A. Downie, G. Hombrecher, Q.-S. Ma, C. D. Knight, and A. W. B. Johnston, John Innes Institute, Colney Lane, Norwich, NR4 7UH, UK.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плазмида *pRL1J1* передается с высокой эффективностью, поэтому существует возможность выявлять *Tn5*-транспозиции из хромосомы в *pRL1J1*, ведя отбор на устойчивость к канамицину среди реципиентных клеток *R. leguminosarum*, которые не содержат ни *Tn5*, ни *pRL1J1*. Таким способом было получено 200 независимых вставок *Tn5* в *pRL1J1* [18]. Три из таких вставок привели к появлению мутантов *Nod*⁻ и десять — мутантов *Fix*⁻.

Плазмиды этих мутантов были проанализированы в агарозных гелях. Гибридизацией ДНК с использованием радиоактивно меченной пробы (плазмиды *pKan2* [22]), содержащей ДНК *Tn5*, было показано, что в *pRL1J1* присутствует транспозон *Tn5*. Совместная трансдукция подтвердила, что за дефекты симбиоза ответствен *Tn5*.

Характеристика *Fix*⁻-мутантов

По морфологическим свойствам клубеньков мутантные *Fix*-штаммы можно разделить на две группы. Штаммы с аллелями *fix-78* и *fix-17* индуцируют мелкие бледно-розовые клубеньки, окраска которых свидетельствует о том, что в них содержится меньше леггемоглобина, чем в нормальных. Электронная микроскопия тонких срезов таких клубеньков по методу Беринджера и др. [2] показала, что часть клеток растения содержит внешне нормальные бактероиды и такие растительные клетки отличаются от клеток, содержащих *Rhizobium* дикого типа, только наличием крупных зерен крахмала (рис. 12.1, а). Однако в этих не фиксирующих азот клубеньках много пустых растительных клеток, тогда как в нормальных клубеньках все клетки в зоне азотфиксации содержат много бактероидов.



Рис. 12.1. а, б. Электронные микрофотографии клубеньков, индуцированных двумя мутантами *R. leguminosarum*, несущими аллели *fix-78* (а) и *fix-3* (б): Б — бактероид; ПМ — периактеронная мембрана; ИИ — инфекционная нить; НКР — нефиксирующие клетки растения.

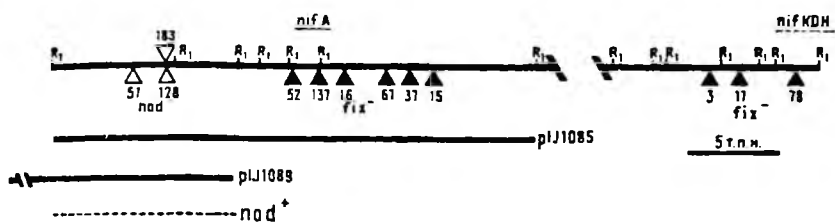


Рис. 12.2. Область плазмиды pRL1J1, контролирующая образование клубеньков и фиксацию азота. Черными треугольниками изображены *fix*-аллели, а белыми треугольниками — *pod*-аллели. Сайты рестрикции установлены с помощью картирования двух серий космид, сконструированных на основе векторов pLAFRI [17] или pSAE1 [9]. Участки гомологии с генами *nifKDH* и *nifA* *K. pneumoniae* установлены с помощью плазмид pSA30 [8] или pMC71a [7], взятых в качестве проб для гибридизации. Относительная ориентация двух участков не определена.

Fix-Штаммы, несущие аллели *fix*-3, -15, -16, -36, -52, -67 или -137, индуцируют зеленые или желтые клубеньки. Небольшая часть растительных клеток содержит недифференцированные бактерии без перибактероидной мембраны. Структура таких растительных клеток, как и большого числа неинфицированных клеток, очень мало организована. Поразительно, что инфекционные нити некоторых клубеньков содержат намного больше бактерий, чем нити клубеньков дикого типа (рис. 12.1, b).

Геномную ДНК выделяли из каждого мутантного штамма и расщепляли нуклеазами *EcoRI* и *BamHI*. Расщепленные молекулы ДНК лигировали с малыми многокопийными плазмидами из *E. coli* и проводили отбор трансформантов, устойчивых к канамицину. Поскольку *EcoRI* не разрезает Tn5, а *BamHI* разрезает его в одном сайте, но вне гена устойчивости к канамицину [15], «*EcoRI*»-клоны должны содержать ДНК *Rhizobium* по обе стороны от Tn5, а «*BamHI*»-клоны — с одной стороны от этого транспозона. Таким образом был построен ряд ДНК-клонов, картирование которых велось с помощью *EcoRI*, *BamHI* и *HindIII*. Сравнение карт различных клонов выявило большое сходство некоторых из них. Например, клоны с аллелями *fix*-15, -16, -37, -67 и -137, по-видимому, содержат похожие рестрикционные фрагменты. Перекрестная гибридизация подтвердила, что в них находится один и тот же участок ДНК pRL1J1. Аналогично этому оказалось, что аллели *fix*-137 и *fix*-52 содержатся в одном и том же фрагменте *EcoRI*. Три других *fix*-аллеля (*fix*-3, -17 и -78) оказались тесно сцепленными на участке ДНК, который не перекрывается участками, описанными выше (рис. 12.2). Используя пробы, полученные на основе описанных клонов, мы идентифицировали несколько космидных клонов, несущих нормальную ДНК. Одна из таких космид гибридизовалась с обоими участками локализации *fix*-аллелей, и данные по картированию показали, что оба участка разделены приблизительно 30 т. п. н. ДНК.

Nod -Мутанты

Три *nod*-аллеля (*nod-57*, *nod-128* и *nod-183*) оказались расположенными в одном *EcoRI*-фрагменте ДНК длиной 6,6 т. п. н. ДНК которого была использована в качестве пробы для гибридизации с банком генов *R. leguminosarum*, клонированным в составе космиды pLAFRI с широким кругом хозяев [17]. Два космидных клона, обозначенных pIJ1085 и pIJ1089, были способны гибридизоваться с пробой. При их картировании выяснилось, что они имеют только два общих *EcoRI*-фрагмента: фрагмент 6,6 т. п. н., в котором локализованы *nod*-аллели, и *EcoRI*-фрагмент 3,3 т. п. н.

Из рестрикционной карты плазмиды pIJ1085 стало ясно, что она содержит участок ДНК, в котором располагаются *fix*-аллели -52, -137, -67, -16, -37 и -15. Таким образом, было установлено сцепление этих *fix*-аллелей с *nod*-аллелями (рис. 12.2).

Перенос способности к образованию клубеньков и признака круга хозяев с помощью клонированной ДНК

При переносе pIJ1085 или pIJ1089 в мутантные штаммы, несущие аллели *nod-57*, -128 или -183, трансконъюганты индуцировали у гороха образование клубеньков, способных к фиксации азота. Эти две плазмиды были внесены в штамм *R. leguminosarum* B15 [5], выделенный от его симбиотических плазмид. Клубеньки опять сформировались, но они не связывали азот, поскольку ни pIJ1085 ни pIJ1089 не несет гены нитрогеназы.

Штамм 8401 является производным штамма 8002 *R. phaseoli*, который утратил ответственную за симбиоз плазмиду pRP2JI [16]. После внесения pIJ1085 или pIJ1089 в штамм *R. phaseoli* 8401 трансконъюганты индуцировали клубеньки у гороха. Это показывает, что признак круга хозяев и способность к образованию клубеньков на горохе детерминируются участком ДНК не более 10 т. п. н.

Участки гомологии с генами *nif* *Klebsiella*

Воспользовавшись гомологией ДНК между генами *nifKDH* *K. pneumoniae* и *R. leguminosarum* [19, 21], мы идентифицировали участок клонированной ДНК *R. leguminosarum*, гомологичный пробе pSA30. В результате было установлено, что *EcoRI*-фрагмент длиной 2,5 т. п. н., в котором локализован аллель *fix-78*, содержит ДНК, гомологичную участку *nifKDH* *K. pneumoniae*.

Аналогичным образом удалось идентифицировать участок гомологии ДНК, используя плазмиду pMC71a [7], которая включает фрагмент ДНК, содержащий весь ген *nifA* и частично гены *nifB* и *nifL*. Как показано на рисунке 12.2, существует гомология между этой пробой и фрагментом ДНК 1,8 т. п. н., в котором локализованы аллели *fix-52* и *fix-137*.

Анализ локализации дефектных по симбиозу мутантов, индуцированных транспозоном Tn5 на плазмиде pRL1J1, свидетельствует о том, что гены *nod* и *fix* на этой плазмиде тесно сцеплены; это подтверждают и полученные ранее генетические данные [11]. Сцепление между генами *nod* и *fix* отмечалось также у *R. meliloti* [1, 17, 20].

Сообщалось [19, 21], что только гены *nifD* и *nifH* *K. pneumoniae* гибридизуются с ДНК ризобий. Однако мы наблюдали гибридизацию между плазмидой pMC71a (которая несет весь ген *nifA*) и pRL1J1 на участке, содержащем *fix*-аллели. У *K. pneumoniae* продукт гена *nifA* активирует выражение *nif*-генов [7], и гибридизация между этим геном и ДНК pRL1J1 дает основания полагать, что сходный ген имеется и у *R. leguminosarum*. Недавно было показано, что участок *nifA*, клонированный в составе вектора с широким спектром хозяев, контролирует активацию экспрессии *nif*-генов у *Azotobacter* (Кеннеди и Робсон, в печати).

Интересно отметить, что плазмиды pIJ1085 и pIJ1089, имеющие общий участок ДНК всего в 10 т. п. н., обе могут придавать способность индуцировать клубеньки на горохе после переноса в клетки штаммов *R. leguminosarum*, вылеченных от их симбиотических плазмид, или даже в клетки штамма производного *R. phaseoli*. Следовательно, способность к индукции клубеньков и признак круга хозяев, по-видимому, детерминируются относительно небольшим участком ДНК pRL1J1, общим для двух указанных выше плазмид.

Благодарности. Мы признательны С. Лонг за плазмиду pLAFR1, М. и Ф. Кэннонам за плазмиду pMC71a и К. Кеннеди и Р. Робсону за сообщение неопубликованных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Beringer JE, Johnston AWB, Wells B (1977) The isolation of conditional ineffective mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 98:339—343
3. Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol* 120:421—429
4. Brewin NJ, Beringer JE, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB, Hirsch PR (1980) Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 116:261—270
5. Brewin NJ, Wood EA, Johnston AWB, Dibb NJ, Hombrecher G (1982) Recombinant nodulation plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 128:1817—1827
6. Buchanan Wollaston AV, Beringer JE, Brewin NJ, Hirsch PR, Johnston AWB (1980) Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *Mol Gen Genet* 178:185—190
7. Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Beynon JL, Cannon FC (1981) Role of

- the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 294:776—778
8. Cannon FC, Reidel GE, Ausubel FM (1979) Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterised. *Mol Gen Genet* 174:59—66
 9. Grosveld FG, Dahl H-HM, Boer E de, Flavell RA (1981) Isolation of β -globin-related genes from a human cosmid library. *Gene* 13:227—237
 10. Hirsch PR (1979) Plasmid-determined bacteriocin production in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 112:135—142
 11. Hirsch PR, Montagu M Van, Johnston AWB, Brewin NJ, Schell J (1980) Physical identification of bacteriocinogenic nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120:403—412
 12. Hombrecher G, Brewin NJ, Johnston AWB (1981) Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. *Mol Gen Genet* 182:133—136
 13. Hooykaas PJJ, Brussel AAN Van, Dulk-Ras H Den, Slogteren GMS Van, Schilperoort RA (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291:351—354
 14. Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR, Beringer JE (1978) High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* 276:634—636
 15. Jorgensen RA, Rothstein SJ, Reznikoff WS (1979) A restriction enzyme map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol Gen Genet* 177:65—72
 16. Lamb J, Hombrecher G, Johnston AWB (1982) Transmissible nodulation plasmid in a strain of *Rhizobium phaseoli*. *Mol Gen Genet* 186:449—452
 17. Long SR, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of nod⁻ mutants. *Nature* 198:485—488
 18. Ma Q-S, Johnston AWB, Hombrecher G, Downie JA (1982) Molecular genetics of mutants of *Rhizobium leguminosarum* which fail to fix nitrogen. *Mol Gen Genet* 187:166—171
 19. Nuti MP, Lepidi AA, Prakash RK, Schilperoort RA, Cannon FC (1979) Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature* 282:533—535
 20. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
 21. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
 22. Scott KF, Hughes JE, Gresshoff PM, Beringer JE, Rolfe B, Shine J (1982) Molecular cloning of *Rhizobium trifolii* genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *J Mol Appl Genet* 1:315—326

13. ЕСТЕСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СРЕДИ ПЛАЗМИД РОДА RHIZOBIUM

Н. БРУИН, Н. ДИББ и Г. ХОМБРЕХЕР*

ВВЕДЕНИЕ: ГРУППА ГЕНОВ СИМБИОЗА, РАСПОЛОЖЕННЫХ НА ПЛАЗМИДЕ

Накоплено значительное количество данных, указывающих на то, что структурные гены нитрогеназы у быстрорастущих ризобий располагаются на крупных плаزمидах. На тех же плаزمидах обнаружены и генетические детерминанты индукции клубеньков на корнях бобовых (*nod*) и формирования азотфиксирующих бактериоидов внутри клубеньков (*fix*). Все эти детерминанты симбиоза (*sym*), по-видимому, сгруппированы в одной области длиной около 50 т. п. н., которая составляет менее четверти размера наименьшей из известных «симбиотических» плазмид (см. Дауни и др. в данном сборнике). У штаммов *R. leguminosarum* сходные (если не идентичные) детерминанты симбиоза находятся на плазмиде, которые относятся не менее чем к трем разным группам несовместимости; это свидетельствует о том, что в естественных условиях возможен обмен областью, ответственной за симбиоз между плазмидами, путем генетической рекомбинации *in vivo*. И действительно, перенос симбиотических детерминант между плазмидами разных групп несовместимости был продемонстрирован в нашей лаборатории [1, 4].

Основное внимание в исследовании *Rhizobium* в настоящее время уделяется мутагенезу и картированию генов, существенных для симбиотической азотфиксации. Однако вместо детального анализа детерминант симбиоза, расположенных на одной «модельной» симбиотической плазмиде, в настоящей работе внимание сосредоточено на поразительной по размаху природной генетической изменчивости, выявленной при поверхностном обследовании различных полевых изолятов *R. leguminosarum*. Симбиотические (*Sym*) плазмиды варьируют по размеру, трансмиссивности и группам несовместимости; к тому же наблюдается аллельная вариабельность среди важных для симбиоза генов. Более того, ряд других генов, возможно, влияющих на эффективность симбиоза в целом, присут-

* N. J. Brewin, N. J. Dibb, and G. Hombrecher, John Innes Institute, Colney Lane, Norwich, NR4 7UH, UK.

ствуют в одних *Sym*-плазмидах, но отсутствуют в других. Мы, в частности, сопоставили две *Sym*-плазмиды *R. leguminosarum*: pRL1J1 — сравнительно небольшую, но обладающую высокой трансмиссивностью и несущую детерминанты образования бактериоцина, и pRL6J1 — более крупную нетрансмиссивную *Sym*-плазмиду, несущую детерминанты реутилизации водорода. Значение подобной генетической изменчивости обсуждается в связи с рассчитанными на перспективу усилиями на пути к генетическому улучшению эффективности симбиоза *Rhizobium* с бобовыми растениями.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМИДЫ, НЕСУЩЕЙ ДЕТЕРМИНАНТЫ ГИДРОГЕНАЗЫ

У некоторых штаммов *Rhizobium* водород, выделяющийся из бактериоидов в виде побочного продукта азотфиксации, вновь вовлекается в метаболизм системой поглощения водорода (*hup*), регенерирующей АТФ [8]. Мы попытались выяснить, сцеплены ли гены *hup* с расположенными на плазмиде детерминантами *nod* и *fix* у штамма *R. leguminosarum* 128C53, полевого изолята *Hup*. Анализ лизатов штамма 128C53 в агарозных гелях выявил наличие двух плазмидных полос [3]. *Sym*-Плазмида была идентифицирована по способности ДНК меньшей из этих плазмид (pRL6J1) связываться с радиоактивной пробой, содержащей клонированную *nif*-ДНК [9]. Затем pRL6J1 была удалена из штамма 128C53 в два этапа: на первом этапе она была заменена после конъюгации на несовместимую плазмиду, производную pRL3J1, несущую ген устойчивости к канамицину; затем был получен спонтанный, чувствительный к канамицину вариант, который, как установлено, утратил плазмиду, внесенную на первом этапе. У «вылеченного» таким образом штамма B151 отсутствуют гены *nod* и *fix*; он является удобным реципиентным штаммом для проверки фенотипов

13.1. Плазмиды *R. leguminosarum*, относящиеся к одной группе несовместимости

Плазмида	Штамм-источник	Приблизительный размер, МДа	Маркеры*				
			Cin/Tn5	Tra	Nod	Fix	Hup
pRL6J1	128C53	190	—	—	+	+	—
pRL1J1	248	130	+	+	+	+	—
pRL3J1	306	130	+	+	—	—	—
pRL4J1	309	160	+	+	—	—	—
pIJ1008	Рекомбинантная**	195	+	+	+	+	—

* Cin — недиаализуемый бактериоцин; Tn5 — устойчивость к канамицину, определяемая транспозоном (варианты каждой из таких плазмид существуют в виде Cin::Tn5); Nod — индукция клубеньков на корнях гороха; Fix — связывает N₂ в клубеньках (важна часть структурные гены нитрогеназы); Hup — способность поглощать водород.

** pIJ1008 является рекомбинантной плазмидой, образовавшейся *in vivo* между pRL6J1 и pRL4J1 Cin::Tn5.

ряда трансмиссивных симбиотических плазмид. Особый интерес представляют данные о том, что при внесении *Sym*-плазмиды в штамм В151 из полевого *Hup*⁻-изолята *R. leguminosarum* (248) трансконъюганты были *Nod*⁺, *Fix*⁺, но *Hup*⁻. Следовательно, штамм 128С53, по-видимому, утратил *hup*-детерминанты после удаления плазмиды рRL6JI. Свойства плазмид, использованных в этих генетических скрещиваниях, представлены в таблице 13.1.

МОБИЛИЗАЦИЯ *Sym*- И *HUP*-ДЕТЕРМИНАНТ ИЗ ШТАММА 128С53

К сожалению, оказалось, что рRL6JI не способна к автономной передаче из штамма 128С53. Поэтому необходимо было мобилизовать *sym*-детерминанты посредством рекомбинации с трансмиссивной плазмидой, которая несет ген устойчивости к канамицину в качестве маркера, позволяющего вести отбор на трансмиссивность плазмиды. Внесение трансмиссивной плазмиды, производной рRL4JI, всегда сопровождалось рекомбинацией с плазмидой рRL6JI, поскольку они принадлежат к одной и той же группе несовместимости: был сделан вывод, что первым продуктом рекомбинации является коинтегра́т этих двух плазмид (хотя его невозможно наблюдать в виде отдельной полосы в агарозном геле). При последующем отборе по признаку *kan*, перенесенному в новый реципиентный штамм, были получены рекомбинантные плазмиды, которые приобрели гены *nod* и дополнительные детерминанты *fix* и *hup*. Представляет интерес тот факт, что эти рекомбинантные плазмиды были одинакового размера (195 МДа). Одна из них, рIJ1008, подвергнута дальнейшему изучению (см. табл. 13.1).

КООРДИНИРОВАННОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ДЕТЕРМИНАНТ *HUP* И *FIX*

Гены *hup* штамма 128С53 генетически сцеплены с детерминантами *nod* и *fix*, более того, выражение гидрогеназной активности в корневых клубеньках гороха тесно связано с выражением *fix*-генов. Некоторые данные на этот счет сведены в таблице 13.2.

13.2. Координированное выражение детерминант поглощения водорода и фиксации азота в клубеньках на корнях гороха [4, 11]

Штамм*	Наблюдаемый фенотип**	
	<i>Fix</i> ,	<i>Hup</i>
	нмоль C ₂ H ₄ /(растение·ч) × 10 ³ , имп/мин ³ H ⁻ /(50 мг клубеньков·ч)	
1062	395 ± 88	0,03 ± 0,01
1062 рIJ1008	630 ± 144	62,7 ± 16,3
116	< 1,0	0,03 ± 0,02
116 рIJ1008	< 1,0	0,04 ± 0,02

* рIJ1008—*nod*⁺*fix*⁺*hup*⁺; 1062—*R. leguminosarum* дикого типа (вариант штамма 300); 116—1062 *fix*⁻ [11].

** Об условиях измерения восстановления ацетилена и включениях трития см. [4].

В опыте был использован штамм 116, мутант *hup*⁻ штамма 1062, который способен формировать бактериоиды, но не связывает азот [11]. Внесение рJI1008 в клетки штамма 116 не подавило фенотип *Fix*⁻: у трансконъюгантов появилось менее 1 %-ной гидрогеназной активности, которая в норме присуща рJI1008 на генетическом фоне *Fix*⁺. Даже инкубация срезанных корней с клубеньками в течение 6—24 ч в присутствии 15 % H_2 была недостаточна для индукции гидрогеназной активности. Уровень экспрессии генов гидрогеназы рJI1008 был также очень низким в клетках шести других *Fix*⁻-мутантов. Сходные результаты получены в опытах с участием *Fix*⁻-мутанта *R. japonicum* [12].

ЕСТЕСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БЕЛКОВ НИТРОГЕНАЗЫ

Анализ бактериоидных белков посредством электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле (рис. 13.1) показал, что наличие признака *hup* не было единственным обнаруживаемым различием между рJI1008 и другими *Sym*-плазмидами, такими, как рRL10JI и рRL10JI. Сравнение бактериоидов, полученных от производных выделенного штамма В151, содержавшего плазмиду рJI1008 или рRL10JI, выявило ряд разных полипептидных полос, кодируемых плазмидами. Наиболее заметное различие состояло в том, что рJI1008 определяет компонент нитрогеназы Ia с несколько более высокой электрофоретической подвижностью. Подтверждение тому, что данные полосы относятся к нитрогеназе, получено посредством блоттинга белков на нитроцеллюлозу [5] с последующим применением антисыворотки к компоненту I (любезно предоставленной д-ром Т. Бисселингом) и реакцией окрашивания вторым антителом [13].

Поскольку рRL10JI и рJI1008 — совместимые *Sym*-плазмиды удалось создать штаммы, меродиплоидные по данным детерминантам нитрогеназы. На рисунке 13.1 показано, что в меродиплоиде преобладает форма нитрогеназы с повышенной подвижностью, хотя и присутствует небольшое количество кодируемого плазмидой рRL10JI компонента Ia, что выявилось с помощью иммунного блоттинга. В меродиплоиде, содержащем рRL10JI и рJI1009 (т. е. рJI1008 Δfix), изомер Cla с повышенной подвижностью отсутствует и можно заметить лишь компонент, характерный для рRL10JI. Пока неизвестно, отражают ли различия в подвижности компонента нитрогеназы Ia различия в первичной последовательности структурных генов или в посттрансляционной модификации рассматриваемых полипептидов.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА *Sym*-ПЛАЗМИДЫ

Выше мы показали существование естественной генетической изменчивости среди *Sym*-плазмид *R. leguminosarum* в отношении как существенных для симбиоза генов (например, нитрогеназы

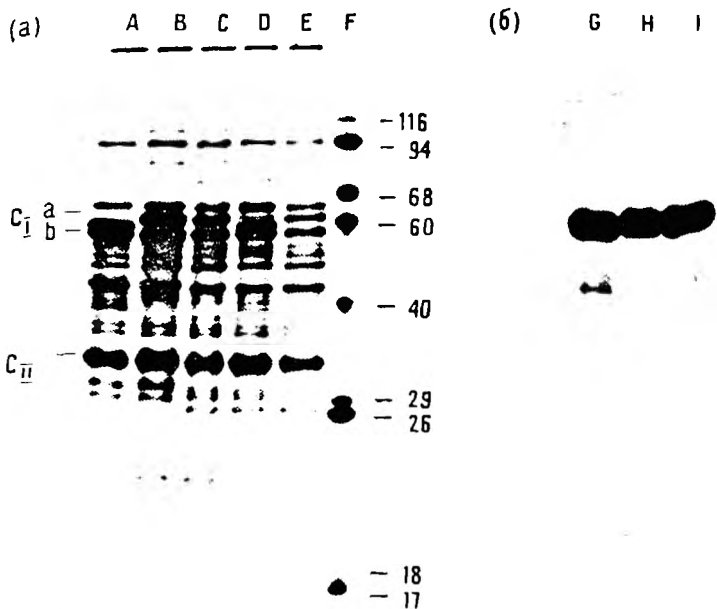


Рис. 13.1, а. Естественная изменчивость бактериодных белков, детерминированных плазмидой. Профили белков из бактериодов, содержащих различные *Sym*-плазмиды, окрашенных кумасси-голубым, в ДСН-полиакриламидных гелях:

A — B151 pIJ1008; *B* — B151 pRL1011; *C* — 1062 (*Sym*-плазмиды=pRL1031). *Ia*, *Ib* и *II* — положения компонентов нитрогеназы; дорожки *D* и *E* получены от меродиплоидов, содержащих pRL1031, а также внесенную *Sym*-плазмиду: *D* — 1062, pIJ1008, *E* — 1062 pIJ1009 (т. е. pIJ1008 Δfix); дорожка *F* содержит белки-маркеры с указанными молекулярными массами маркеров.

б. Специфическое окрашивание белков компонента I нитрогеназы из бактериодов B151 pIJ1008 (*G*); 1062 (*H*); 1062 pIJ1008 (*I*). Белки из ДСН-полиакриламидного геля были перенесены на нитроцеллюлозу, обработаны кроличьими антителами против компонента I, затем обработаны козлиной антисывороткой против кроличьего γ -глобулина, связанной с пероксидазой, и окрашены хлоронафтолом (25 мкг/мл) и 0,01 %-ной перекисью водорода в соответствии с методом Таубина и др. [13].

так и несущественных для симбиоза генов (например, гидрогеназы). Поскольку *Sym*-плазмиды иногда способны к перемещению между штаммами посредством конъюгации и область *sym*-генов иногда передается между плазмидами посредством рекомбинации *in vivo*, то существует возможность улучшить штаммы *Rhizobium* путем перегруппировки генов, используя естественную генетическую изменчивость и естественную половую репродукцию бактерий. В сотрудничестве с Д. Филлипсом и Т. Де Йонгом (США) мы осуществили программу по «селекции *Rhizobium*» с помощью переноса *Sym*-плазмид. Как и в любой другой селекции

13.3. Улучшение штаммов *Rhizobium* посредством переноса плазмид

Штамм <i>P. leguminosarum</i>	Сухая масса растений, г/растение*	Содержание в растении общего азота, мг/растение
300	3,98±0,10	153±4,0
300 pIJ1008	4,58±0,26	198±9,1
3622	2,00±0,11	60±3,3
3622 pIJ1008	3,75±0,11	127±2,6
128C53	4,05±0,14	138±4,8

* Среднее из 7 повторностей через 35 дней роста без добавления азота.

онной программе, можно ожидать, что появится потомство как превосходящее по рассматриваемым признакам родительские формы, так и уступающее им [6, 7]. Некоторые из позитивных результатов представлены в таблице 13.3.

Sym-Плазмида pIJ1008 была внесена в клетки двух полевых изолятов *R. leguminosarum*, каждый из которых нес совместимую *Sym*-плазмиду. Об эффективности симбиоза судили по общей массе растений гороха, которая зависит от симбиотической фиксации N_2 . Растения гороха выращивали в банках Леонарда в контролируемых условиях [7]. Эффективность сконструированных штаммов сравнивали с эффективностью исходных полевых изолятов, а также штамма 128C53, от которого произошли *sym*- и *hup*-детерминанты плазмиды pIJ1008. После проведения ростового эксперимента было показано, что бактерии, извлеченные из клубеньков, принадлежат к соответствующему штамму-инокулянту. При внесении в клетки штамма 300 плазмиды pIJ1008 масса растений увеличилась на 15%, а фиксация N_2 — на 30% в сравнении с контролем (штамм 300 без плазмиды) (табл. 13.3). Этот штамм превосходил обоих родителей, вовлеченных в скрещивание [7].

ПЕРЕНОС *HUP*-ДЕТЕРМИНАНТ В КЛЕТКИ *R. PHASEOLI*

Поскольку ни у одного из известных полевых изолятов *R. phaseoli* не было обнаружено системы повторного вовлечения в метаболизм водорода (*hup*), мы вносили pIJ1008 в ряд штаммов *R. phaseoli* и испытывали потомство в клубеньках фасоли на гидрогеназную активность. Результаты типичных опытов приведены в таблице 13.4. При внесении в *R. phaseoli* *hup*-детерминанты плазмиды pIJ1008 экспрессировались в клубеньках *Phaseolus*, хотя уровень активности был невысоким. Наиболее существенным, однако, было то, что в результате внесения плазмиды pIJ1008 резко упала нитрогеназная активность. Негативное влияние pIJ1008 в клетках *R. phaseoli*, по-видимому, можно объяснить тем, что, кроме *hup*-детерминант, плазмида несла также детерминанты *nod* и *fix*, приспособленные функционировать в клубеньках на корнях гороха. Поэтому можно предположить, что взаимодействие генов

13.4. Гидрогеназная и нитрогеназная активности в клубеньках фасоли после внесения рIJ1008 в клетки *R. phaseoli* 8002 (измерение через 28 дней после инокуляции). Даны средние значения для 6 растений, выращенных на 0,5 %-ном агаре, содержащем среду Фаргуса

Внесенная плаزمид	Наблюдаемый фенотип	
	Hup*	Fix**
Без плазмиды	0,04±0,01	464±154
рIJ1008	10,7±5,1	71±71

* 10⁸ нмп/мин *H/(50 мг клубеньков·ч).

** ммоль C₂H₄/(растение·ч).

nod и *fix* плазмиды рIJ1008 с соответствующими детерминантами на совместимой *Sym*-плазмиде *R. phaseoli* неблагоприятно для рассматриваемого процесса.

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ПЛАЗМИД НА КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТЬ RHIZOBIUM

Другой подход к селекции *Rhizobium* заключался в изучении влияния разных *Sym*-плазмид на конкурентоспособность при формировании клубеньков в смешанных инокулятах (табл. 13.5). Используя в качестве реципиента вылеченный штамм *R. leguminosarum* B151, мы сконструировали ряд вариантов, содержащих шесть различных *Sym*-плазмид, происходящих из разных полевых изолятов *R. leguminosarum*. B151 сам по себе устойчив к стрептомицину. Каждый из упомянутых производных штаммов смешивали в равной пропорции со штаммом 726 — устойчивым к рифампицину вариантом штамма 300. Каждой из таких смесей инокулировали 10 проростков гороха. Через 21 день 15 клубеньков с каждого растения стерилизовали с поверхности и прокалывали стерильной зубочисткой, чтобы определить устойчивость их содержимого к стрептомицину или рифампицину (небольшим числом смешанных

13.5. Влияние разных плазмид на конкурентоспособность *Rhizobium* по индукции клубеньков в смешанных инокулятах

Вариант штамма B151 (Str ^r)	Штамм—источник Нод ⁺ -плазмиды	Число клубеньков, содержащих жизнеспособные бактерии	Клубеньки с Str ^r -клонами*, %
B224	257	73	32 ^a
B166	ТОМ	81	47 ^a
B200	300	82	74 ^b
B155	248	66	77 ^b
B225	279	61	77 ^b
B164	128C53	107	97 ^c

* а, b, с достоверно отличаются друг от друга (p<0,05).

клубеньков пренебрегали). Данные, представленные в таблице 13.5, показывают, что значительные различия в конкурентоспособности по образованию клубеньков могут быть обусловлены специфической *Sym*-плазмидой, внесенной в штамм B151, несмотря на то, что относительные доли бактерий Rif^r и St^r на поверхности корней оставались неизменными. Следует отметить, что внесение всех плазмид привело к возникновению производных штаммов, менее конкурентоспособных, чем B151, pIJ1008 или 128C53 str, исходного полевого изолята, от которого произошел выделенный штамм B151. Вероятно, посредством переноса плазмид легче создать менее эффективный штамм, чем более эффективный: это может быть обусловлено тем, что специфическая *Sym*-плазида приспособлена к генетическому фону штамма, из которого она ведет свое происхождение.

ЗНАЧЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ СРЕДИ *Sym*-ПЛАЗМИД

Можно или не обращать внимания на естественную изменчивость, существующую среди ризобиальных *Sym*-плазмид, или использовать ее. Те, кто предпочел не обращать на нее внимания, утверждают, что гораздо важнее изучить основные свойства, общие для всех штаммов *Rhizobium*, чем незначительные вариации среди разных штаммов. Для таких исследователей основная цель работы — выяснение уникальных генетических особенностей симбиоза в корневых клубеньках, присущих всем ризобиям и бобовым растениям.

С другой стороны, естественную генетическую изменчивость можно использовать в качестве инструмента для изучения взаимоотношений структуры и функции аллельных вариантов существующих для симбиоза генов. Например, каково значение двух видов нитрогеназы, идентифицированных в настоящей работе, а также какова генетическая основа способности штамма *R. leguminosarum* TOM индуцировать клубеньки у сорта гороха типа Afghan [2, 14] и генетическая основа специфичности спектра хозяев у видов *R. leguminosarum*, *R. trifolii* и *R. phaseoli* [10]? Еще одним источником естественной изменчивости обладают гены, присутствующие в некоторых *Sym*-плазмидах, но отсутствующие в других, например детерминанты образования бактериоцина или поглощения водорода. Подобные гены могут вносить количественный вклад в симбиоз, повышая конкурентоспособность или общую эффективность симбиотической азотфиксации, и поэтому заслуживают внимания для полного описания взаимоотношений между *Rhizobium* и их хозяином.

На более примитивном уровне естественная генетическая изменчивость среди плазмидных *sym*-генов может быть использована как основа для селекции *Rhizobium*. Для этих целей область симбиотических генов можно рассматривать как классическую группу сцепления. Необходимо оптимизировать сочетание *sym*-ге-

нов в пределах *sym*-области, области *sym*-генов с природным плазмидным вектором, *Sym*-плазмиды с ризобияльным штаммом хозяина и штаммов *Rhizobium* с бобовым сортом-хозяином. Следует подчеркнуть, что, подобно селекции растений, такую селекцию *Rhizobium* можно вести эмпирически без необходимости определения индивидуальных *sym*-генов на молекулярном уровне.

Благодарности. Мы признательны Э. Вуд за квалифицированную техническую помощь, а также А. Джонстону и Дж. Дауни за их замечания, сделанные при прочтении рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brewin NJ, Beringer JE, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB, Hirsch PR (1980a) Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 116:261—270
2. Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWB (1980b) Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 120:413—420
3. Brewin NJ, DeJong TM, Phillips DA, Johnston AWB (1980c) Co-transfer of determinants for hydrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum*. Nature 288:77—79
4. Brewin NJ, Wood EA, Johnston AWB, Dibb NJ, Hombrecher G (1982) Recombinant nodulation plasmids in *R. leguminosarum*. J Gen Microbiol 128:1817—1827
5. Bowen B, Steinberg J, Laemmli UK, Weintraub H (1980) The detection of DNA binding proteins by protein blotting. Nucleic Acids Res 8:1—20
6. DeJong TM, Brewin NJ, Phillips DA (1981) Effect of plasmid content in *Rhizobium leguminosarum* on symbiosis and host plant functions. J Gen Microbiol 124:1—7
7. DeJong TM, Brewin NJ, Johnston AWB, Phillips DA (1982) *Rhizobium* strain improvement by plasmid transfer. J Gen Microbiol 128:1829—1838
8. Emerich DW, Ruiz-Arguēso T, Ching TM, Evans H (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. J Bacteriol 137:153—160
9. Hombrecher G, Brewin NJ, Johnston AWB (1981) Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. Mol Gen Genet 182:133—136
10. Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR, Beringer JE (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium* Nature 276:635—636
11. Nadler KD (1981) a mutant strain of *Rhizobium leguminosarum* with an abnormality in heme synthesis. In: Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation 414. Aust Acad Sci
12. Ruiz-Arguēso T, Cabrera E, Bertalmio MB (1981) Induction of hydrogenase in non-nitrogenfixing soybean nodules produced by a Hup⁺ strain of *Rhizobium japonicum*. In: Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation. Aust Acad Sci, p 377
13. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350—4354
14. Young JPW, Johnston AWB, Brewin NJ (1982) A search for peas showing strain specificity for symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Heredity 48:197—201

14. АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ КЛУБЕНЬКОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ И БАКТЕРИОИДНЫХ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ ГОРОХА, ИНОКУЛИРОВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM, МУТАГЕНИЗИРОВАННЫМИ ТРАНСПОЗОНОМ

Р. ВАН-ДЕН-БОС, Т. ШЕТГЕНС, Т. БИССЕЛИНГ,
И. ХОНТЕЛЕЗ и А. ВАН КАММЕН*

ВВЕДЕНИЕ

Процесс формирования клубеньков и связывания азота воздуха при симбиозе *Rhizobium* с бобовыми растениями включает цепь взаимодействий между партнерами по симбиозу, при которых каждый из них оказывает влияние на выражение генов другого. Важный шаг в изучении подобных взаимодействий был сделан, когда появилась возможность мутагенизировать геном *Rhizobium* введением транспозона Tn5 [15]. Этот метод позволяет идентифицировать гены, контролирующие образование клубеньков (*nod*) и фиксацию азота (*fix*), и осуществлять их сайт-специфичный мутагенез. Аналогичной методики для выявления генов хозяина, специфически активных в процессе симбиоза, пока что не существует. Однако если Tn5-вставками затронуты существенные для симбиоза гены *Rhizobium*, то можно ожидать, что до некоторой степени будет изменено и выражение нодулиновых генов (кодирующих специфичные для клубеньков белки растения-хозяина [13]). Гены *Rhizobium*, детерминирующие инфекцию и связывание азота, локализованы на крупной природной плазмиде (см. обзоры [5, 10]). У *R. leguminosarum* несколько генов на этой плазмиде активно транскрибируется только в состоянии эндосимбиоза [11]. Поэтому для Tn5-мутагенеза мы исходно выбрали данный участок плазмиды, занимаемый структурными генами *nif*.

В настоящей статье мы опишем эксперименты по изучению синтеза *nif*-белков в клетках Tn5-мутагенизированных *Rhizobium*. Кроме того, изучали влияние Tn5-мутагенеза у *Rhizobium* на синтез специфичных для клубеньков белков в растительных клетках.

* R. C. Van Den Bos, Th. M. P. Schetgens, T. Bisseling, J. G. J. Hontelez and A. Van Kammen, Agricultural University, Department of Molecular Biology, De Dreijen 11, Wageningen, The Netherlands.

Клонирование *nif*-области *R. leguminosarum*. Выделение суммарной ДНК *R. leguminosarum*, частичное расщепление рестриктазой *EcoRI*, фракционирование фрагментов по размеру и создание банка клонов в составе pLAFR1 описаны Фридманом и др. [7]. Гибридизацию колоний банка с pRmR2 [16] в качестве пробы осуществляли по Грунстайну и Валлису [8].

Биохимия ДНК. Все операции проводили так, как описано в работе Рувкуна и др. [17].

Тп5-Мутагенез плазмидных клонов. Использовали два метода. Проведен Тп5-мутагенез кострамидного клона с использованием λ b221 *rex::Tn5c18570_{am8}P_{am29}*, трехродительское скрещивание *R. leguminosarum* и замещение маркеров посредством конъюгации с Str^s-штаммом *E. coli* 2124/pPH1J1.

Перед транспонированием Тп5 *EcoRI*-фрагменты от исходного кострамидного клона субклонировали в *EcoRI*-сайте конъюгативного вектора pSUP201. Детальное описание данного метода Тп5-мутагенеза и конъюгационного переноса в клетки *Rhizobium* будет сделано Симоном и др. (*готовится к печати*).

Фенотип Тп5-мутагенизированных бактерий *R. leguminosarum*. Поверхностно стерилизованные семена *Pisum sativum* (сорт Rondo) инокулировали в стерильном вермикулите штаммами *R. leguminosarum* дикого типа и Тп5-мутагенизированным. Для этого одну свежевыращенную колонию бактерий суспендировали в 5 мл стерильной воды. Через 15 дней у растений проверяли наличие клубеньков. Восстановление ацетилена целым растением измеряли через различные промежутки времени после инфекции [1].

Для выделения больших количеств ризобияльных или растительных белков растения гороха выращивали на гравии.

Фракционирование клубеньков. Белки из цитоплазмы клеток растений, перибактероидного пространства и бактериоидов получали фракционированием клубеньков, как будет описано в работе Бисселинга и др. (*готовится к печати*).

Анализ белков. Электрофорез в ДСН-полиакриламидном геле проводили, как описано ранее Забелом и др. [19]. После электрофореза белки перенесли на нитроцеллюлозные фильтры [4], инкубировали со специфической антисывороткой, а затем с ¹²⁵I-меченным белком А [19]. Радиоактивные полосы на фильтре определяли радиоавтографией.

Специфические антисыворотки. Получение антисывороток, специфичных против нодулинов и секреторных белков *Rhizobium*, будет описано в работе Бисселинга и др. (*готовится к печати*). Антисыворотки, специфичные против компонентов нитрогеназы I и II, описаны Бисселингом и др. [2].

Конструирование *nif*-клона *R. leguminosarum*

В качестве клонирующего вектора для создания банка клонов *R. leguminosarum* была выбрана описанная недавно кострамид рLAFR1 [7]. В составе этого вектора можно клонировать фрагменты размером около 20 т. п. н. рLAFR1 является космидной производной клонирующего вектора рRK290 с низким числом копий и широким спектром хозяев [6]; ее длина 21,6 т. п. н., она придает устойчивость к тетрациклину, содержит единственный *Eco*RI-сайт и может быть мобилизована в клетки *Rhizobium*. Суммарная ДНК из *R. leguminosarum* PRE была подвергнута ограниченному расщеплению рестриктазой *Eco*RI; посредством центрифугирования в градиенте сахарозы выделены ее фрагменты размером 15–30 т. п. н. и лигированы с *Eco*RI-расщепленной рLAFR1. Лигированная ДНК была упакована *in vitro* в головки фага и использована для инфицирования клеток *E. coli* HB 101. Трансформантов отбирали на LB-чашках, содержащих тетрациклин (10 мг/мл). Таким путем было получено 800 Тс^r-колоний, которые по расчетам должны представлять банк 99 % генома *R. leguminosarum* [7].

Колонии были перенесены на нитроцеллюлозные фильтры, и гибридизация колоний с применением ник-транскрибированной [14] вставки, вырезанной из рRmR2 [17] с помощью *Eco*RI и *Bgl*II, в качестве пробы позволила выявить одну позитивную колонию. Из этой колонии выделена плазмидная ДНК [9] и подвергнута расщеплению несколькими рестриктирующими ферментами; таким образом была построена физическая карта рRB10. Блоттинг-гиб-

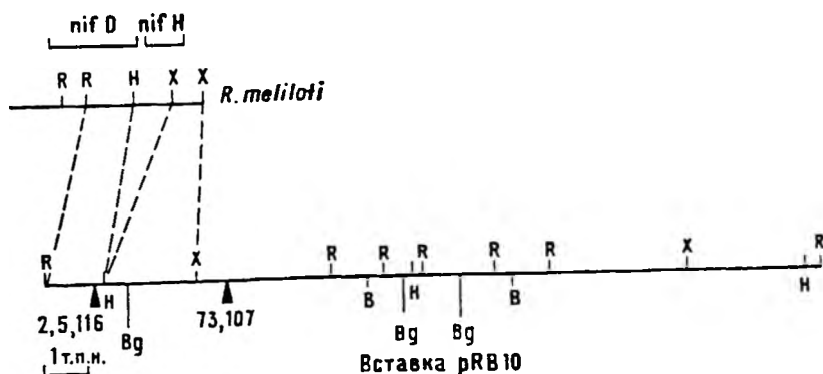


Рис. 14.1. Рестрикционная карта PRE-*nif*-участка, клонированного в плазмиде рRB10. Цифры и стрелки указывают номера и положения Tn5-вставок. На карте рRB10 показана часть *nif*-участка *R. meliloti*, клонированного в плазмиде рRmR2. Отмеченные фрагменты рRmR2 ник-транскрибировали и использовались в качестве проб для блоттинг-гибридизации по Саузерну с рестриктированной ДНК рRB10. Области гомологии указаны штриховыми линиями:

R — *Eco*RI; H — *Hind*III; X — *Xho*I; B — *Bam*HI; Vg — *Bgl*II.

ридизация по Саузерну [18] продуктов расщепления рRB10 под действием *EcoRI* при использовании рRmR2 в качестве пробы показала, что крайний левый *EcoRI*-фрагмент 6,5 т. п. н. плазмиды рRB10 гомологичен *nif*-генам *R. meliloti*. Блоттинг-гибридизация по Саузерну с *XhoI*-фрагментом или *EcoRI-HindIII*-фрагментом из рRmR2, которые соответствуют *nif*-генам *H* и *D* *R. meliloti*, в качестве проб дала результаты, изображенные на рисунке 14.1. Гомология с геном *nifD* выявлена только у крайнего левого *EcoRI-HindIII*-фрагмента, тогда как гомология с геном *nifH* ограничена указанным *HindIII-XhoI*-фрагментом.

EcoRI-Фрагмент 6,5 т. п. н. плазмиды рRB10, гомологичной плазмиде рRmR2, по размеру соответствует *EcoRI*-фрагменту плазмидной ДНК *R. leguminosarum* (рR11 [11]), несущей структурные *nif*-гены.

Тп5-Мутагенез и конъюгация с участием рRB10; замещение маркеров у *R. leguminosarum*

Транспозон Тп5 был встроен в рRB10 в разные места клонированного фрагмента, как описано в материалах и методах. Из 150 Тс^RКм^R-колоний, появившихся в результате трансформации *E. coli* HB101 плазмидной ДНК, выделенной из λ::Тп5-инфицированного штамма HB101/рRB10, восемь идентифицированы с помощью рестрикционного анализа как содержащие Тп5-вставки в левом *EcoRI*-фрагменте размером 6,5 т. п. н. Эти штаммы были взяты для дальнейшего анализа. Мутагенизированная плазида внесена конъюгацией в клетки *Rhizobium*, и Тп5-содержащий фрагмент замещен фрагментом дикого типа из счет гомологичной рекомбинации [15]. Для нахождения точного местоположения Тп5 в геноме *Rhizobium* суммарную ДНК штаммов дикого типа или мутантных штаммов расщепляли различными рестриктирующими ферментами или их комбинацией и подвергали электрофорезу в агарозном геле. Блоттинг-гибридизацию по Саузерну фрагментов, содержащихся в геле, проводили с ник-транслированной рRB10 или с рестрикционными фрагментами, полученными из рRB10. Характер гибридации для Тп5-мутагенизированных штаммов специфически отличается от такового для штамма дикого типа, что позволяет определить положение Тп5-вставки [15]. Положение Тп5-вставки на карте показано на рисунке 14.1. Для штаммов 3, 6 и 26 точное положение Тп5 в левом *EcoRI*-фрагменте 6,5 т. п. н. плазмиды рRB10 еще предстоит выявить.

Фенотип *nif*-Тп5-мутагенизированного штамма PRE

Различными Тп5-мутагенизированными штаммами были инокулированы растения гороха, культивировавшиеся на вермикулите. Найдено, что все штаммы индуцируют клубеньки (*nod*⁺). Микроскопические наблюдения показали, что по форме бактериоды не отличались от бактериодов дикого типа. Измеряли восстановление

Тп5-мутанты

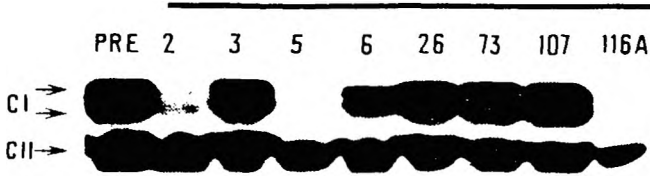


Рис. 14.2. Бактероидные белки, проанализированные на присутствие нитрогеназы. У растений *P. sativum* указанными бактериальными штаммами были индуцированы клубеньки; через 21 день после инокуляции растворимые бактериоидные белки были разделены электрофорезом в ДСН-полиакриламидном геле. На каждую дорожку нанесено по 10 мкг белка. Белки были перенесены на нитроцеллюлозу, и фильтр подвергнут воздействию антисывороток против белков CI и CII; затем комплексы антиген—антитело были визуализованы реакцией с ^{125}I -белком А и радиоавтографией.

ацетилен различными комбинациями *Rhizobium* — растение-хозяин через разные промежутки времени. Штаммы 2 и 5 оказались fix^- , остальные были fix^+ , хотя восстановление ацетилен началось у них примерно на два дня позже. Штамм 116 (fix^+) вел себя аномально в том отношении, что после трех субкультивирований в условиях отбора на Str — Km-устойчивость его фенотип изменился на fix^- . Полученному мутанту присвоили номер 116А. Определение положения Тп5-вставки у штаммов 116 и 116А путем блоттинг-гибридизации по Саузерну с ^{32}P -меченной рRB10 не выявило различия между этими двумя штаммами. fix^+ -Штаммы не отличались от родительского по скорости восстановления ацетиленна. Присутствие белков нитрогеназы CI и CII в бактериоидах различных мутантных штаммов проверяли посредством блоттинга ДСН-полиакриламидных гелей с бактериоидными белками из 21-дневных клубеньков на нитроцеллюлозные фильтры. Затем фильтры инкубировали с антисыворотками против белков CI или CII и, наконец, с ^{125}I -белком А (рис. 14.2). Штаммы 2, 5 и 116 на данной стадии развития содержат небольшие количества CII и следы CI. Еще через несколько дней роста CI из бактериоидов исчезает, а содержание CII снижается (не показано). Другие Тп5-мутатенизированные штаммы (3, 26, 73, 107, 116) вполне сравнимы с диким типом по таким признакам, как способность к образованию клубеньков и фиксация азота. Белки нитрогеназы у них синтезируются, хотя их появление слегка задержано.

Леггемоглобины в клубеньках гороха, индуцированных Тп5-PRE-мутантами

После инфекции растений различными Тп5-PRE-мутантами из клубеньков выделяли цитоплазматические белки. Их разделяли

электрофорезом в ДСН-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр. Затем инкубировали с антисывороткой против белка Lb и после этого — с ^{125}I -белком А. Радиоавтография частей этого фильтра, содержащего Lb (рис. 14.3), показывает количества Lb, индуцированного разными PRE-штаммами, через различные интервалы времени посева и инокуляции. Так, через 16 дней штамм дикого типа обнаруживает количество Lb, которое заметно не увеличивается в дальнейшем, штаммы 3, 26, 107 после короткой задержки индуцируют примерно такое же количество Lb, что и штамм дикого типа. В случае fix⁻-штаммов 2 и 5 количество Lb вначале сходно с таковым дикого типа, а затем снижается.

Нодулины, индуцируемые Tn5-мутагенизированным штаммом PRE

С помощью специфических антисывороток можно выявить до 30 нодулинов в цитоплазме клеток клубеньков гороха (Бисселинг и др., *готовится к печати*). С целью выяснения функции этих нодулинов мы анализировали изменения нодулиновых белков, индуцированных Tn5-мутагенизированными инфицирующими клетками *Rhizobium*. Нодулины выделяли из растений через 21 день после инфекции различными Tn5-PRE-штаммами и анализировали с помощью белкового блоттинга и инкубации с антинодулиновой сывороткой и ^{125}I -белком А. На радиоавтографе (рис. 14.4) в каждом случае проявлялся ряд нодулинов, из которых наиболее заметен белок Lb. У fix⁻-штаммов 2 и 5 количество Lb снижено. То же справедливо и для нодулинов 15 и 17, соответствующих белкам с молекулярными массами приблизительно 43×10^3 и 40×10^3 . Это может означать, что данные нодулины играют роль в фиксации азота. Другие нодулины, которые не репрессированы у мутантов, могут быть вовлечены в образование клубеньков на ранних этапах этого процесса.

Секреторные белки *Rhizobium*

Клетки штамма *R. leguminosarum* PRE в культуре секретируют ряд белков, реагирующих с антисывороткой против нодулинов. Следовательно, эти белки могут секретироваться бактериоидами также и в цитоплазме растения-хозяина. Чтобы доказать это, мы получили антисыворотку против секреторных белков свободноживущего штамма PRE и установили, что с этой сывороткой реагирует ряд белков в цитоплазме хозяина и в перибактероидном пространстве (Бисселинг и др., *готовится к печати*). Мы постарались выяснить, изменены ли описанные Tn5-мутагенизированные штаммы ризобий в отношении секреции своих белков внутри растительных клеток. Растворимые цитоплазматические белки клубеньков были разделены ДСН-гель-электрофорезом и после блоттинга белков фильтр инкубировали с сывороткой против секреторных белков. Радиоавтография, проведенная после инкубации с ^{125}I -белком

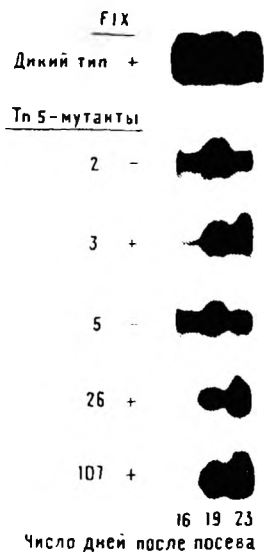


Рис. 14.3. Концентрация белка Lb в клубеньках, индуцированных ризобияльными мутантами. Растворимые белки были выделены из клубеньков гороха, индуцированных указанными штаммами *Rhizobium*, через различные интервалы времени после посева. На дорожку наносили по 10 мкг белка и обрабатывали антисывороткой против Lb, как указано в подписи к рисунку 14.2. Показана часть радиоавтографа, соответствующая белку Lb.

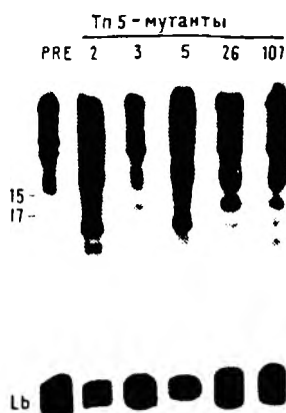


Рис. 14.4. Нодулины в клубеньках, индуцированных мутантами *Rhizobium*. Растворимые белки были выделены из клубеньков гороха, индуцированных указанными штаммами *Rhizobium*, через 21 день после посева; 10 мкг белка на дорожку проанализировано, как указано в подписях к рисункам 14.2 и 14.3, с помощью антисыворотки против нодулинов гороха. Цифры слева соответствуют белкам, указанным в работе Бисселинга и др. (готовится к печати).

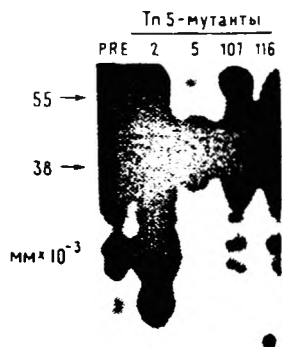


Рис. 14.5. Секреторные ризобияльные белки в клубеньках, индуцированных мутантными бактериями. Растворимые белки были выделены из клубеньков гороха, индуцированных штаммами *Rhizobium*, и проанализированы, как указано в подписях к рисункам 14.2 и 14.4 (по 10 мкг белка на дорожку). Фильтры обрабатывали антисывороткой против секреторных белков штамма *R. leguminosarum* PRE.

А (рис. 14.5), указывает на наличие у штамма PRE очень мощной полосы белка 38 кДа. Кроме того, с антисывороткой прореагировал и ряд других белков. Для мутанта 5 полоса, соответствующая белку 55 кДа, слабая, а белки с молекулярной массой 38 кДа отсутствуют; следовательно, секреция бактериоидных белков в цитоплазму хозяина была затронута мутагенезом *nif*-области.

ОБСУЖДЕНИЕ

Транспозонный мутагенез представляет полезный способ индукции сайт-специфичных изменений в каком-либо участке генома *Rhizobium*. Мы начали изучение влияния мутаций у *Rhizobium* на выражение их генома и генома растения, мутагенизируя рекомбинантную плазмиду pRB10. Вывод о том, что ДНК *Rhizobium*, клонированная в составе pRB10, содержит *nif*-участок, основан на том, что левая часть плазмиды pRB10 гомологична *nif*-участку *R. meliloti* (pRmR2 [15]) и что Tn5-вставки в этом участке приводят к *fix*⁻-фенотипу. Данные по гибридизации (рис. 14.1) позволяют установить приблизительную локализацию генов *nifD* и *nifH*. Ген *nifK*, вероятно, не находится на pRB10 или находится на ней лишь частично.

Хотя Tn5-вставки брались наугад, из общего их числа 150 в *EcoRI*-фрагменте pRB10 размером 6,5 т. п. н., нам не удалось выявить различий в положении вставки у мутантов 2, 5 и 116. Возможно, данный сайт представляет «горячую точку» Tn5-вставок у *Rhizobium*. Исходя из фенотипа мутантов 2 и 5 (*fix*⁻), мы пришли к выводу, что у них затронут *nif*-участок. Тот факт, что у них синтезируется белок, идентичный по подвижности белку нитрогеназы CII (рис. 14.2), в то время как белок CI обнаруживался в небольшом количестве, показывает, что вставки занимают участок между генами *D* и *H*. Следовательно, эти вставки, видимо, аналогичны вставкам в геноме *R. meliloti* между генами *D* и *H*, о которых сообщают Рувкин и др. [16]. Слабая активность в отношении восстановления ацетилена в случае таких мутантов объясняется неполной полярностью действия указанных Tn5-вставок на ген *nifD* у *R. meliloti*. Мы не обнаружили восстановления ацетилена мутантами 2 и 5 в период от 14 до 35 дней после инокуляций, хотя CI и CII присутствовали, правда, в неравных количествах. С другой стороны, у штамма 116 со вставкой оба компонента нитрогеназы присутствуют в том же количестве, что и у дикого типа, и скорость восстановления ацетилена нормальная. Этот факт вынуждает нас принять, что *nif*-оперон у *R. leguminosarum* PRE транскрибируется в одну единую РНК с молекулярной массой около $1,2 \times 10^6$ [12], но для гена *D* (и, возможно, *K*) имеется второй промотор, который активен у мутанта 116, но крайне малоактивен у мутантов 2 и 5. Подобная модель согласуется с нашими прежними наблюдениями, что синтез CI и CII у штамма PRE скоординирован не строго. Соотношение уровней CI/CII варьирует в зависимости от стадии развития бактериоидов [3], и в ходе развития клубеньков CI появля-

ется раньше, чем С11 [2]. Нам пока не удается объяснить природу фенотипических различий штаммов 116 и 116А. За исключением штаммов 2, 5 и 116А, все остальные имеют фенотип fix⁺, хотя азотфиксирующая активность у них проявляется на несколько дней позже, чем у родительского штамма. Это может быть связано с наблюдаемыми изменениями в составе нодулинов. Что касается количества белка Lb, мы полагаем, что у штаммов 2 и 5 синтез Lb исходно индуцируется (до нормального уровня), но спадает при отсутствии активного связывания азота, это согласуется с нашими наблюдениями о том, что синтез Lb предшествует синтезу нитрогеназы [2]. У других штаммов с Tn5-вставками концентрация Lb возрастает нормальным образом. Что касается других нодулинов то наблюдаются изменения в содержании белков 15 и 17, которые практически отсутствуют у fix⁻-мутантов. В то же время интенсивность других нодулиновых полос у этих штаммов также изменена, как и у fix⁺-штаммов. Мы предполагаем, что во взаимодействиях *Rhizobium* с хозяином могут быть вовлечены белки, секретируемые эндосимбионтом. Используя антисыворотки против секреторных белков, мы действительно наблюдали снижение концентрации белка с молекулярной массой 55×10^3 Да в цитоплазме хозяина, тогда как ряд белков с молекулярной массой, меньшей 38×10^3 Да не обнаруживался после инфекции гороха Tn5-мутантом [5]. В настоящее время, однако, нам не удается приписать какую-либо функцию этим нодулинам или секреторным белкам *Rhizobium*.

Благодарности. Мы признательны докторам Г. Рувкуну, Ф. Де Бруйку и Ф. Аусюбелю за помощь в клонировании pRB10. Настоящее исследование финансировалось Организацией развития чистых исследований Нидерландов и Организацией биологических исследований Нидерландов. Мы благодарны докторам Р. Симону и А. Пюлеру за сообщение подробностей их метода мобилизации генов до его опубликования, Р. Крутцену — за техническую помощь при анализе нодулинов, П. Мадерну — за изготовление иллюстраций и М. Ван-Неервену — за печатание рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bisseling T, Bos RC van den, Kammen A van (1978) The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghaemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*. *Biochim Biophys Acta* 539:1—11
2. Bisseling T, Moen AA, Bos RC van den, Kammen A van (1980) The sequence of appearance of leghemoglobin and nitrogenase components I and II in root nodules of *Pisum sativum*. *J Gen Microbiol* 118:377—381
3. Bos, RC van den, Bisseling T, Kammen A van (1978) Analysis of DNA content, nitrogenase activity and in vitro protein synthesis of *Rhizobium leguminosarum* bacteroids in sucrose gradients. *J Gen Microbiol* 19:131—139
4. Bowen B, Steinberg J, Lammli UK, Weintraub H (1980) The detection of DNA-binding proteins by protein-blotting. *Nucleic Acids Res* 8:1—20
5. Dénarié J, Boistard P, Casse-Delbart F, Atherly AG, Berry JO, Russel P (1980) Indigenous plasmids of *Rhizobium*. *Int Rev Cytol Suppl* 13:225—246
6. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DN

- cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA 77:7347-7351
7. Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Construction of a broad host range cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18:289-296
 8. Grunstein M, Wallis J (1979) Colony hybridization. Meth Enzymol 68:379-389
 9. Holmes DS, Quigley D (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. An Biochem 114:193-197
 10. Kondorosi A, Johnston AWB (1981) The genetics of *Rhizobium*. Int Rev Cytol Suppl 13:191-223
 11. Krol AJM, Hontelez JGJ, Bos RC van den, Kammen A van (1981) Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of *Rhizobium leguminosarum*. Nucleic Acids Res 8:4337-4347
 12. Krol AJM, Hontelez JGJ, Roozendaal B, Kammen A van (1982) On the operon structure of the nitrogenase genes of *R. leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. Nucleic Acids Res 10:4147-4157
 13. Legocki RP, Verma DPS (1980) Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. Cell 20:153-163
 14. Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113:237-251
 15. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature 289:85-88
 16. Ruvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982a) Site directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of the *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation (*nif*) genes. Cell 29:551-559
 17. Ruvkun GB, Long SR, Meade HM, Bos RC van den, Ausubel FM (1982b) ISRml: A *Rhizobium meliloti* insertion sequence which preferentially transposes into nitrogen fixation (*nif*) genes. J Mol Appl Genet (in press)
 18. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517
 19. Zabel P, Moerman M, Straaten F van, Goldbach R, Kammen A van (1982) Antibodies against the genome-linked protein VPg of cowpea mosaic virus recognize a 60,000-dalton precursor polypeptide. J Virol 41:1083-1088

15. СВОБОДНОЖИВУЩИЕ РИЗОБИИ СВЯЗЫВАЮТ N₂ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ СВОЕГО РОСТА С ПОМОЩЬЮ МЕХАНИЗМА ПЕРЕКРЕСТНОГО ПИТАНИЯ

Р. ЛЮДВИГ*

ВВЕДЕНИЕ

Ризобии — уникальные организмы среди охарактеризованных азотфиксирующих прокариотов в том отношении, что они не diaзотрофы, т. е. N₂ для них не является единственным источником азота. Связывание азота происходит в процессе симбиоза этих организмов с высшими растениями, когда они существуют в виде бактериоидов в корневых клубеньках. В состоянии симбиоза бактериоды *Rhizobium* выступают в роли дифференцированных органелл клеток растения, восстанавливающих N₂ до NH₃, но не усваивающих NH₃ путем включения в аминокислоты. Они экспортируют NH₃ в цитозоль клеток растения-хозяина, где азот ассимилируется с помощью ферментов растения [3].

Некоторые медленно растущие штаммы *Rhizobium* способны фиксировать N₂ в микроаэробной культуре [7, 8, 11, 12, 13]. Поскольку ризобии — облигатные аэробы, потребность в большом количестве АТФ для азотфиксации должна удовлетворяться за счет окислительного фосфорилирования, при котором для переноса электронов в качестве их конечного акцептора используется O₂. Микроаэробные условия необходимы потому, что внутриклеточный кислород легко взаимодействует с белками, переносящими электроны, и нитрогеназой в ходе фиксации азота, что сопряжено с возникновением свободных радикалов и приводит в дальнейшем к летальному исходу.

Возникает вопрос: почему подобные штаммы *Rhizobium* не являются микроаэрофильными diaзотрофами? В настоящей статье будут обсуждены данные экспериментов по изучению физиологии штаммов *Rhizobium* sp. в условиях микроаэробноза, предположительно обеспечивающих связывание азота свободноживущими бактериями. Эти детальные эксперименты убедительно доказывают, что такие штаммы *Rhizobium* не способны расти и одновременно связывать азот. Более того, здесь представлены данные, которые

* R. A. Ludwig, Department of Biology, University of California, Santa Cruz, CA 95064, USA.

позволяют предполагать, что азотфиксация свободноживущими клетками *Rhizobium* sp. осуществляется после их перехода в состояние, метаболически отличное от состояния вегетативно растущих бактерий. Продуцируемый при этом аммоний экспортируется клетками и может быть использован для перекрестного питания других, голодающих по азоту *Rhizobium*, которые остаются в состоянии вегетативного роста. Я полагаю, что перекрестное питание потомков одного клона в бактериальной популяции ризосферы имеет селективное преимущество, обусловленное связыванием азота свободноживущими *Rhizobium*.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АССИМИЛЯЦИЯ АЗОТА ШТАММАМИ RHIZOBIUM SP.

Недавно был описан мутантный штамм, производный *Rhizobium* sp. 32Н1 (RC3200), который непрерывно связывает N_2 в культуре в условиях недостатка O_2 , если он в избытке обеспечен углеродом (в виде сукцината и L-арабинозы) и азотом (в виде глутамата) [9]. Этот штамм, RC3205, был получен как ревертант глутаминового (gln) ауксотрофа; он обладает конститутивно неаденилированной глутаминсинтетазой (GlnS I), но, как и родительский штамм RC3201, остается дефектным по GlnS II [10]. Штамм дикого типа RC3200 в указанных условиях культивирования не ассимилирует аммоний, получаемый фиксацией N_2 , включением в аминокислоты, а экспортирует его [9].

Поскольку при некоторых условиях культивирования — избытке углерода (в виде сукцината и L-арабинозы) и азота (в виде глутамата) и недостатке O_2 — RC3205 обладает способностью непрерывно синтезировать нитрогеназный ферментный комплекс и усваивать аммоний, тогда как штамм дикого типа RC3200 не способен ни на то, ни на другое, возникает вопрос, что же произойдет при исчерпании глутамата? Будет ли RC3205 продолжать расти, используя N_2 в качестве единственного источника азота? Результаты представленных здесь опытов, без сомнения, позволяют дать отрицательный ответ. В связи с этим может быть поставлен вопрос более общего характера: способны ли ризобии одновременно и расти, и фиксировать свободный азот или же эти активности предполагают взаимоисключающие метаболические состояния ризобияльного организма? Пока нельзя дать окончательный ответ на последний вопрос, однако результаты приведенных здесь экспериментов служат косвенным доказательством в пользу того, что такие метаболические состояния действительно взаимно исключают друг друга.

ОПЫТЫ ПО ВЫРАЩИВАНИЮ РИЗОБИЙ В МИКРОАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Штаммы *Rhizobium* культивировали на водяных банях с постоянной температурой 28 °C при непрерывном пропускании через

суспензии газовых смесей с заданным составом. Газовые смеси сначала пропускали через нитроцеллюлозный фильтр ($\varnothing 0,54$ мкм), выдерживающий высокое давление, а затем через 20 %-ную H_2SO_4 , чтобы очистить газ от примесей NH_3 . Концентрацию растворенного O_2 измеряли с помощью кислородного электрода (модель Кларка) с поправкой на ионную силу среды и барометрическое давление. Подсчет жизнеспособных клеток осуществляли с высокой воспроизводимостью результатов с помощью автоматических пипеток при $30^\circ C$. Большое число независимых определений показало воспроизводимость подсчета жизнеспособных клеток, причем отклонения от среднего числа из трех независимых измерений укладывались в 5 %. В ростовые среды включали 0,1 % тритона X-100, который препятствует образованию клеточных агрегатов, мешающих точным подсчетам жизнеспособных клеток, но не оказывает на них никакого другого влияния, о чем судили, сравнивая опытные варианты с контрольными. Общее содержание белка определяли в экстрактах клеток, разрушенных ультразвуком, с помощью кумасси-голубого модифицированным спектрофотометрическим методом.

ПРИ НЕДОСТАТКЕ СВЯЗАННОГО АЗОТА МИКРОАЭРОБНЫЕ КУЛЬТУРЫ RC3200 И RC3205 ТЕРЯЮТ СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ КОЛОНИЙ

Аэробные культуры RC3205, выращенные на минимальной среде заданного состава с сукцинатом и L-арабинозой в качестве избыточного источника углерода и L-глутаматом в качестве ограничивающего источника азота, при исчерпании глутамата переходят в стационарную фазу роста. После этого в течение 2 нед жизнеспособность клеток, измеренная по способности формировать колонии, остается постоянной, варьируя лишь в пределах экспериментальной ошибки измерений (данные не представлены).

Однако микроаэробные культуры RC3200 в этих условиях обнаружили резкое снижение способности к образованию колоний (рис. 15.1). Микроаэробноз достигался непрерывным пропусканием смеси газов следующего состава: 0,2 % O_2 , 1,0 % CO_2 и 98,8 % N_2 . После исчерпания запасов азота (в виде глутамата) независимо от его исходного уровня в культурах RC3200 происходило экспоненциальное снижение способности к формированию колоний (рис. 15.1, а, в). Горизонтальные асимптоты кривых экспоненциального роста, которым следовали такие культуры, зависели от исходного количества азота (ограничивающий фактор) и были идентичными при аэробном и микроаэробном росте. Поэтому исчерпание связанного азота в условиях микроаэробноза приводило к последующей утрате способности к образованию колоний. Титры клеток, взятые из этих культур, были в основном идентичными в зависимости от того, какую среду использовали для измерения жизнеспособности — обогащенную или минимальную с заданным химическим составом.

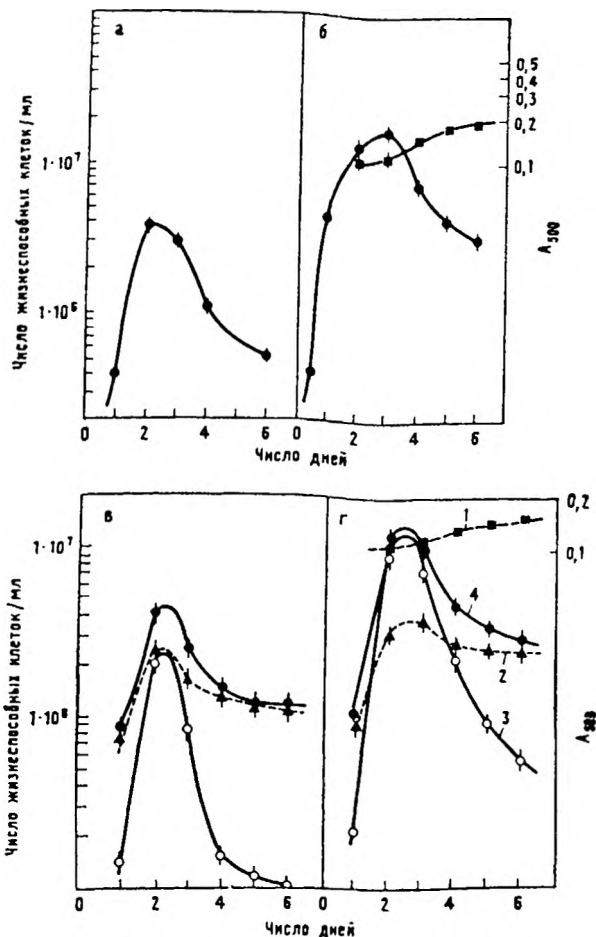


Рис. 15.1, а—г. Подсчет числа жизнеспособных клеток в культурах RC3200 и RC3205 при микроаэробнозе в условиях недостатка азота. Клетки RC3200 культивировали в средах MAS (минимальная с избытком арабинозы и сукцината) + +6,6 мкМ L-глутамата (а) или 66 мкМ глутамата (б) в качестве источника N при 28 °C и непрерывном пропускании газовой смеси следующего состава: 0,2 % O₂, 1,0 % CO₂ и 98,8 % N₂. Аликвоты брали через указанные интервалы времени, разбавляли и высевали в трех повторностях для подсчета жизнеспособных клеток на твердую среду (GYPC). Когда мутность культуры превышала A_{520nm} = 0,01, ее начинали измерять (1). RC3205 выращивали в среде MAS + +6,6 мкМ глутамата (в) или 66 мкМ глутамата (г). При подсчете жизнеспособных клеток делили на две группы: образующие колонии за нормальное время (2) и за большее время (Dcf-фенотип) (3); указано также общее число жизнеспособных клеток (+). Минимальная ростовая среда MAS содержала: 0,2 % сукцината калия, pH 6,3; 0,4% L арабинозы; 7,5 мМ K₂PO₄, pH 6,3; 0,2 мМ MgSO₄; 1 мкМ FeCl₃; 1 мкМ Na₂MoO₄ и указанные количества L-глутамата, добавленного в качестве источника N. Твердая среда GYPC содержала: 0,4 % D-глюкозы; 0,2 % дрожжевого экстракта; 7,5 мМ K₂PO₄, pH 6,3; 0,2 % казеинокислот.

При постоянном пропускании газа в условиях недостатка азота концентрация растворенного O_2 постоянно оставалась на уровне порядка 3 мкМ. Мутность культур, когда это было возможно, определяли по светорассеянию при 500 нм. При истощении запасов глутамата мутность тем не менее, хоть и медленно, со временем продолжала возрастать (рис. 15.1). В то время как способность к образованию колоний утрачивалась, общее содержание белка в клетке сохранялось на постоянном уровне. Следовательно, лизиса клеток в этот период не было. Мутность культур могла возрастать из-за непрерывного синтеза внеклеточных полисахаридов, которому способствовал избыток L-арабинозы в среде.

Культуры RC3200, ограниченные по азоту, были оценены по их способности возобновлять рост после повторного внесения в среду глутамата в период потери способности к формированию колоний (данные не представлены). После периода задержки, длительность которого пропорциональна времени, прошедшему после исчерпания в среде запасов глутамата, рост культур возобновлялся.

По длительности периода задержки невозможно было установить, возобновляли ли рост в подвергнутых голоданию культурах лишь оставшиеся жизнеспособными клетки или же начинали расти вновь все клетки (полностью жизнеспособные + предположительно нерастущие). Поскольку у аэробных культур потеря способности к образованию колоний в условиях недостатка азота не наблюдалась, предположили, что RC3200 при микроаэробном недостатке азота находится в состоянии, метаболически отличающемся от состояния вегетативно растущих клеток в этих условиях. Причем можно считать, что 90 % всех клеток перешли в это особое состояние (рис. 15.1).

Микроаэробные культуры RC3205 при недостатке азота также теряли способность к формированию колоний, однако их поведение в этих условиях было более сложным. По способности формировать колонии жизнеспособные ризобияльные клетки можно разбить на две группы: формирующие колонии в течение нормального периода времени (5 дней при 30 °C) и требующие для этого дополнительно 2 дня (фенотип Dcf с задержкой формирования колоний, рис. 15.1, в, г). Эти группы отчетливо различаются. Клетки Dcf впервые появлялись при исчерпании глутамата и в максимуме составляли 50 % от общего числа клеток, однако их появление всегда было непродолжительным (рис. 15.1, в, г). Через некоторое время число клеток Dcf быстро падало. Построив график зависимости общего числа клеток RC3205 (Dcf + полностью жизнеспособные) от времени, обнаружили, что в популяции происходит потеря способности к формированию колоний, аналогичная наблюдаемой у штамма RC3200 (рис. 15.1, а—г). Эти результаты показали, что штамм RC3205 ведет себя примерно так же, как штамм RC3200 при микроаэробнозе и недостатке азота, а также позволили обнаружить временно появляющуюся популяцию клеток Dcf.

Одно из объяснений подобных результатов состоит в том, что клетки Dcf находятся в некоем промежуточном состоянии между двумя разными метастабильными состояниями.

КУЛЬТУРЫ RC3205 И RC3200 В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТКА O₂ СВЯЗЫВАЮТ N₂ НЕ ИСЧЕРПЫВАЮТ УСВОЯЕМЫЙ АЗОТ И СКОЛЬКО-НИБУДЬ ЗАМЕТНО НЕ ТЕРЯЮТ СПОСОБНОСТИ К ОБРАЗОВАНИЮ КОЛОНИЙ

В сходных микроаэробных условиях культивирования, когда содержание глутамата было повышено до 0,7 мМ, культуры начинали испытывать недостаток O₂ (рис. 15.2). (Поскольку род *Rhizobium* состоит из облигатных аэробов, RC3200 должен использовать O₂ в качестве конечного акцептора электронов, чтобы сохранять окислительно-восстановительное равновесие.) В этих условиях концентрация растворенного O₂ снижалась с 3 мкМ, что наблюдается при недостатке азота, до 1 мкМ и ниже. Однако рост клеток по-прежнему продолжался. Достигалась стационарная фаза таких культур, при которой плотность жизнеспособных клеток составила 3×10^8 /мл, что соответствовало предсказанной плотности клеток для случая истощения глутамата. В таких условиях недостатка кислорода наблюдалось лишь незначительное сниже-

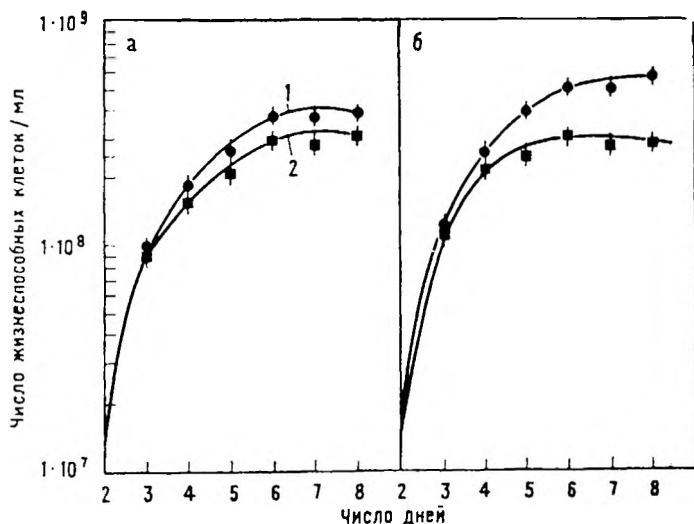


Рис. 15.2, а, б. Жизнеспособность культур RC3200 и RC3205 при недостатке O₂. RC3200 (а) и RC3205 (б) выращивали в среде MAS+0,7 мМ глутамата в условиях, указанных в подписи к рисунку 15.1, за исключением добавок, обогащающих среду углеродом: L-арабинозы (1,0 %) и сукцината (0,4 %). В самом начале культуры были разделены и через них пропускали смеси газов: 0,2 % O₂, 1,0 % CO₂ и N₂ (1) или аргон (2) до 100 % при 28 °С. Зависимость числа жизнеспособных клеток от времени определяли, как описано выше. Определение активности нитрогеназы по прямому экспорту аммония в данных условиях было описано ранее [9].

ние способности к образованию колоний, хотя наблюдения велись не менее двух недель. При такой плотности клеток (свыше 10^8 /мл) появлялась возможность измерять нитрогеназную активность по прямому выделению аммония, о чем уже сообщалось [9]. Чтобы установить, способствует ли фиксация азота росту клеток при недостатке кислорода, газообразный азот в смеси газов, пропускаемых через культуры, заменили аргоном. В случае аргона и у штамма RC3200, и у RC3205 было обнаружено некоторое замедление роста (рис. 15.2). В стационарной фазе роста культур RC3200 и RC3205 количество жизнеспособных клеток в варианте с N_2 было вдвое выше, чем в варианте с аргоном (рис. 15.2). Таким образом, в условиях недостатка кислорода связанный азот способствовал росту клеточной массы.

Полученные результаты показывают, что при недостатке азота и концентрации O_2 порядка 3 мкМ фиксации N_2 в количествах, достаточных для восполнения этого недостатка, не происходит (рис. 15.1). (Низкая плотность клеток в культурах, испытывающих недостаток азота, препятствует обнаружению какой-либо азотфиксирующей активности.) Кроме того, поскольку титр жизнеспособных клеток в культурах при недостатке кислорода продолжал возрастать, оказалось невозможным установить долю ризобияльных клеток, перешедших в состояние, характеризующееся отсутствием роста.

НИ RC3200, НИ RC3205 НЕ РАСТУТ НА СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ N_2 В КАЧЕСТВЕ ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА АЗОТА

Как уже отмечалось, при культивировании RC3205 в микроаэробных условиях при 3 мкМ O_2 и 6,6 или 66 мкМ глутамата (т. е. в ограничивающих рост концентрациях) в качестве источника азота рост клеток после исчерпания глутамата прекращался (рис. 15.1, в, г). Как уже говорилось, условия микроаэробноза при недостатке в среде азота не позволяют изучаемым штаммам переключиться на N_2 как на источник азота для продолжения роста. Можно предполагать, что эти условия не способствуют фиксации заметных количеств азота. Если у *Rhizobium* существует, пока что гипотетическая, репрессия генов *nif*, опосредованная O_2 , и она аналогична наблюдаемой у *Klebsiella pneumoniae* [6], то O_2 в концентрации 3 мкМ может оказывать репрессирующее действие и у *Rhizobium*. Поскольку в дополнительных опытах по сравнению с ходом жизнеспособных клеток в условиях микроаэробноза, т. е. при концентрации O_2 3 мкМ, при недостатке связанного азота и при пускании газовой смеси, содержащей N_2 или аргон, различий не обнаружилось (данные не представлены), сделан вывод, что фиксация азота, если она вообще имеет место, не приводит к повышению выхода клеток. Результаты всех проведенных экспериментов показывают, что необходимое условие фиксации N_2 — недостаток O_2 (концентрация < 1 мкМ).

Чтобы окончательно выяснить, может ли RC3200 или RC3205 расти, используя N_2 в качестве единственного источника азота, необходимо было создать условия культивирования с недостатком связанного азота и O_2 . Это осуществлялось путем пропускания через культуры газовой смеси следующего состава: 20 мкл/л O_2 , 1,0 % CO_2 и 99 % N_2 или аргона. При этом концентрация O_2 (практически не поддающаяся определению) была все же достаточной для медленного роста, пока не были исчерпаны другие питательные вещества. При исчерпании глутамата культуры испытывали также и недостаток O_2 ($O_2 < 1$ мкМ). Культуры RC3200 не проявили существенных различий по титру жизнеспособных клеток и их выходу при пропускании N_2 в сравнении с аргоном (рис. 15.3). С другой стороны, снижение способности к образованию колоний было слишком медленным и незначительным, чтобы его можно было обнаружить (рис. 15.3). Низкие плотности клеток вновь позволили провести прямые измерения активности нитрогеназной активности в указанных условиях. Плотность жизнеспособных клеток RC3205 в сравнении с RC3200 была вдвое больше при N_2 , чем при аргоне. Общее содержание клеточного белка также было пропорционально выше. Это означает, что в данных условиях фиксированный азот способствовал возрастанию клеточной массы RC3205. Тем не менее культуры RC3205 достигли стационарной фазы при плотности клеток порядка 6×10^7 клеток/мл, после чего последовало очень медленное снижение способности к формированию колоний (рис. 15.3). Таким образом, для каждого из этих штаммов не удалось показать непрерывный, зависимый от N_2 рост клеток. Вместе с тем в культурах, которые были лимитированы по связанному азоту и по O_2 , не наблюдалось явно выраженной утраты способности к формированию колоний.

Поведение культур *Rhizobium* sp. в условиях микроаэробноза было достаточно сложным по отношению к фиксации N_2 , метаболическая роль которого в этих условиях осталась невыясненной. Однако можно сделать несколько упрощающих предположений, которые облегчат интерпретацию полученных результатов:

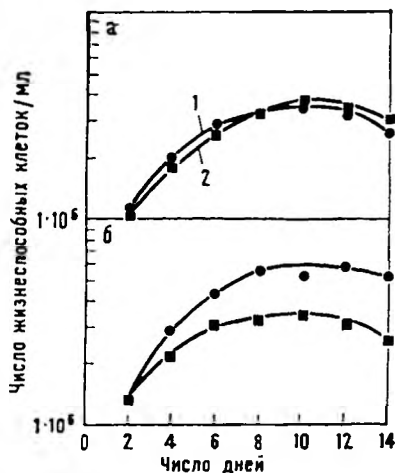


Рис. 15.3, а, б. Рост штаммов RC3200 и RC3205 в культуре при недостатке N и O_2 . Штаммы RC3200 (а) и RC3205 (б) культивировали, как указано в подписи к рисунку 15.1, в среде MAS+6,6 мкМ глутамата; через культуры непрерывно пропускали 20 млн⁻¹ O_2 , 1,0 % CO_2 и N_2 (1) или аргона (2) до 100 %. Зависимость числа жизнеспособных клеток от времени определяли, как указано в подписи к рисунку 15.1.

1. Фиксация N_2 свободноживущими клетками при недостатке O_2 имеет место и способствует возрастанию выхода клеток, однако в целом культуры не растут при недостатке в среде связанного азота, даже в присутствии N_2 .

2. При концентрации O_2 порядка 3 мкМ, когда фиксация N_2 отсутствует или по крайней мере субоптимальна, недостаток связанного азота приводит к резкому снижению способности к образованию колоний среди ризобияльных клеток. Это явление затухает избытком связанного азота или фиксацией N_2 , так как в клеточной популяции некоторые клетки продолжают расти.

Приняв сформулированные выше упрощающие предположения, можно заключить, что такие культуры содержат смеси ризобияльных клеток, находящихся в различных состояниях, что переход между такими состояниями можно до некоторой степени предсказывать и что фиксация N_2 осуществляется клетками, находящимися в состоянии, отличном от состояния вегетативно растущих клеток. Поскольку в этих условиях фиксация N_2 приводит к выделению в среду аммония, выдвигаемая гипотеза предполагает необходимость того, что связывание атмосферного азота способствует росту вегетативных ризобияльных клеток посредством механизма перекрестного питания.

СВЯЗЫВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА СВОБОДНОЖИВУЩИМИ РИЗОБИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ МОЖЕТ СПОСОБСТВОВАТЬ ИХ РОСТУ ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕКРЕСТНОГО ПИТАНИЯ

Для проверки этой гипотезы были созданы микроаэробные культуры (с недостатком связанного азота) мутантных штаммов Nif^- , производных штамма RC3200. В условиях недостатка азота поведение одного из них, RC3312, отличалось от поведения штамма дикого типа RC3200 как при концентрации O_2 порядка 3 мкМ, так и при ограниченном содержании O_2 (< 1 мкМ) (рис. 15.4, а). RC3312 в отличие от RC3200 не обнаруживал снижения способности к формированию колоний при 3 мкМ O_2 (рис. 15.4, а). В культуре RC3312 при недостатке кислорода и пропускании через него N_2 скорость роста была не выше, чем в контрольном варианте, в котором пропускали аргон, такое поведение соответствует Nif^- фенотипу этого штамма (данные не представлены).

RC3312 культивировали совместно с RC3505 — устойчивым к хлорамфениколу (Cam^R) Nif^+ -производным штамма RC3200 — в условиях недостатка связанного азота и O_2 . В то время как RC3505 обнаруживал утрату способности к образованию колоний после исчерпания глутамата, RC3312 продолжал расти (рис. 15.4). На основании этих результатов был сделан вывод, что RC3505 при этом перекрестно снабжает аммонием RC3312 Nif^- .

Поскольку микроаэробная культура RC3312 не обнаруживала потерю способности к формированию колоний, то мутантный фенотип Nif^- у RC3312 предположительно является плеiotрофным (другие штаммы Nif^- проявляют потерю жизнеспособности) и,

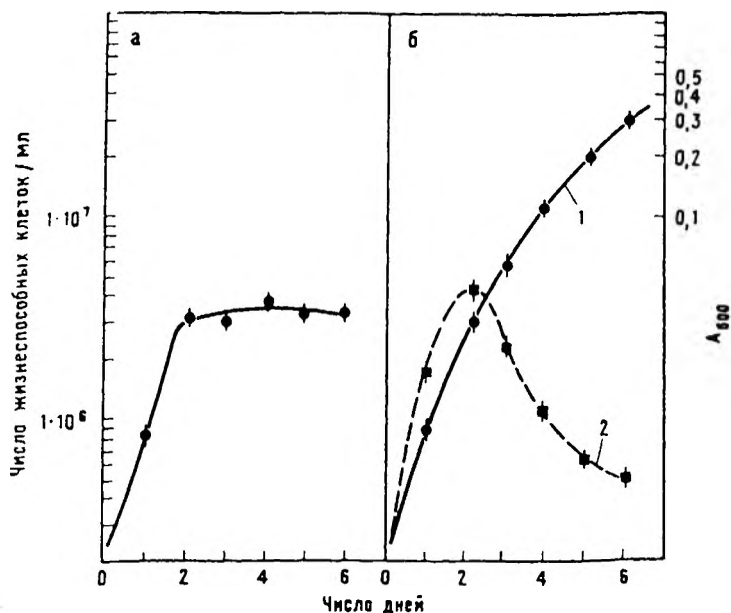


Рис. 15.4. а, б. Зависимое от *nif*-генов перекрестное питание между штаммами *Rhizobium*. а. Клетки RC3312 $Egy^{+}nif^{-}$ выращивали в среде MAS+6.6 мкМ глутамата, как указано в подписи к рисунку 15.1, б. Смесь клеток RC3312 (1) и RC3505 $Sam^{+}nif^{+}$ (2) культивировали в условиях недостатка N и O_2 , как указано в подписи к рисунку 15.3, при пропускании через культуру азота. Число жизнеспособных клеток относительно времени определяли, как указано в подписи к рисунку 15.1, путем высева их на среды GYPC+Egy (200 мкг/мл) и GYPC+Sam (200 мкг/мл).

соответствии с предложенной гипотезой, у него нарушена способность к переключению между разными клеточными состояниями. Восполнение недостатка связанного азота в смешанной культуре путем фиксации N_2 штаммом RC3505 приводило к облегчению избирательного роста RC3312, что опять-таки, по-видимому, объясняется неспособностью клеток штамма RC3312 перейти в другое состояние. Мутантный аллель (аллели) у RC3312 остается неохарактеризованным, известно только, что ревертанты Nif^{+} могут отбираться в клубеньках. С другой стороны, тот факт, что RC3505 теряет способность к образованию колоний в смешанной культуре, свидетельствует о том, что культура в целом испытывала недостаток связанного азота, поскольку аммоний, продуцируемый штаммом RC3505 путем фиксации N_2 , усваивался штаммом RC3312.

Какой же вывод можно сделать об ассимиляции азота в ходе перекрестного питания аммонием? Аммоний, продуцируемый путем фиксации N_2 , теоретически доступен для поддержания роста ризобияльных клеток. Это положение оспаривалось на основании результатов проведенных ранее экспериментов, показавших, что аммоний может ассимилироваться ризобиями лишь с помощью

15.1. Бактериальные штаммы*

Штамм	Фенотип	GlnS I	GlnS II	Nif
RC3200	Дикий тип	+	+	+
RC3201	Gln ⁻	Ад	-	-
RC3205	Gln ⁺ -ревертант RC3201	H. a.	-	++
RC3312	Ery ^R , Nif ⁻	+	+	-
RC3505	Cam ^R	+	+	+

* Ад—аденилированный; H. a.—конститутивно неаденилированный; Nif —фенотип относится к бактериальным клеткам как в культуре, так и в клубеньках.

ферментов GlnS I и II и что при анализе таких микроаэробных культур GlnS I оказался существенно аденилированным (и потому неактивным), а GlnS II обнаружен не был [9, 10]. Однако подобные результаты ферментного анализа относятся к популяциям клеток в целом. Поскольку результаты описанных здесь экспериментов показывают что можно наблюдать ризобиальные клетки в разных состояниях (т. е. их популяции гетерогенны), прежние результаты должны быть пересмотрены. Перекрестное питание аммонием требует, чтобы нерастущие клетки, активно фиксирующие N₂, содержали аденилированный GlnS I и чтобы растущие клетки, ассимилирующие аммоний, содержали по крайней мере частично неаденилированный GlnS I.

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях микроаэробной культуры при недостатке связанного азота у штаммов *Rhizobium* sp. RC3200 и RC3205 наблюдалась специфическая утрата способности к образованию колоний. Поскольку подобная потеря способности к формированию колоний происходит в микроаэробной культуре, в которой эти штаммы могут прекрасно расти при избытке азота, и поскольку штамм RC3205 проявляет дополнительное физиологическое состояние Dc⁻ можно заключить, что такое состояние отсутствия роста запрограммировано и определяется микроаэробным недостатком азота. Описание таких особых состояний клеток, факторов, участвующих в переходах между этими состояниями, и выяснение вопроса о том, обратимы ли подобные превращения, — задача будущих исследований. Очевидно, что весьма желательно разделить гетерогенные популяции на их компоненты, однако осуществить это пока не удалось.

Существует ли причинная связь между состоянием клеток, характеризующимся отсутствием роста, и активной фиксацией N₂? Представляется обоснованным предположение о том, что такое состояние клеток может быть предпосылкой к связыванию N₂. При этом энергия катаболизма может быть эффективно направлена на обеспечение процессов фиксации молекулярного азота электро-

ми с высоким восстанавливающим потенциалом равно как и АТФ, без конкуренции со стороны ростовых процессов.

Обоснован ли вывод о том, что активная фиксация N_2 протекает при концентрациях растворенного кислорода ниже 1 мкМ? Установлено, что медленно растущие штаммы *Rhizobium* обладают многими цитохромоксидазами с чрезвычайно высоким сродством к O_2 ($K_m = 10^{-8}$ М), которые обеспечивают эффективное протекание связанного с дыханием окислительного фосфорилирования, при таком крайне низком уровне O_2 [2].

Почему штамм, подобный RC3205, который способен непрерывно синтезировать нитрогеназу и ассимилировать аммоний в условиях, позволяющих фиксировать N_2 , не растет, непосредственно используя N_2 в качестве источника азота? RC3205 действительно достигает стационарной фазы (если иметь в виду гомогенную культуру) в условиях недостатка O_2 (рис. 15.3) и утрачивает способность к образованию колоний при микроаэробнозе и недостатке азота. Можно заключить, что, помимо открытого цикла регуляции усвоения азота, имеются дополнительные механизмы контроля, обуславливающие подобные изменения в данных условиях. Во всяком случае усвоения аммония недостаточно для поддержания роста клеток RC3205 в этих условиях. Несмотря на то что данный штамм содержит конститутивно неаденилируемую GlnS I, отсутствие роста в указанных условиях приведет к накоплению нуклеотидов и аминокислот, с участием которых осуществляется аллостерическое ингибирование GlnS I, что в конечном итоге приведет к прекращению усвоения аммония [5].

Если особое состояние нерастущих клеток действительно является предпосылкой к связыванию азота свободноживущими *Rhizobium*, то исходя из этого можно объяснить неспособность суспензионных культур одновременно расти и связывать N_2 . Здесь все клетки находятся в одних и тех же условиях среды, что позволяет выдвигать предположения о природной экологии изучаемых процессов в ризосфере. Возможно, что в пределах колонии клетки *Rhizobium* могут принимать специализированные функциональные состояния, определяемые доступностью питательных веществ и кислорода. Клетки, расположенные на поверхности колонии, имеют преимущества в отношении доступа к питательным веществам, кислороду и соответственно должны расти быстрее. Некий внутренний слой клеток, испытывающих недостаток в связанном азоте и O_2 , но находящихся в оптимальных условиях для фиксации азота, может переключиться в требуемое состояние и экспортировать продуцируемый аммоний в поверхностный слой клеток, обеспечивая их непрерывный рост. Это дало бы штаммам *Rhizobium*, способным связывать N_2 посредством указанного механизма, селективное преимущество, при условии, что экспортируемый ими аммоний использовался бы главным образом для перекрестного питания особей одного и того же клона. Выдвигаемая теория предполагает, что ризобияльные клетки, связывающие атмосферный азот, должны быть окружены клетками своего же клона, что впол-

не реально. Необходимо более глубокое изучение гомогенной и гетерогенной организации сообществ почвенных микроорганизмов, динамики их популяции и их функциональной организации.

Благодарности. Работа поддержана дотациями автору от Бюро по дотациям для конкурсных исследований Министерства сельского хозяйства США, Национального фонда науки США и Фонда К. и Г. Дрейфусов. Автор выражает признательность Г. Де Фризу за полезные дискуссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Appleby CA (1969) Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. I. Biochim Biophys Acta 172:71—87
2. Bergersen FJ, Turner GL (1980) Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybeans and cowpea and of N₂-fixing bacteria grown in continuous culture. J Gen Microbiol 118:235—252
3. Brown CM, Dilworth MJ (1975) Ammonium assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J Gen Microbiol 86:38—48
4. Ching TM, Henke S, Newcomb W (1977) Isolation of bacteria, transforming bacteria, and bacteroids from soybean nodules. Plant Physiol 60:771—780
5. Ginsburg A, Stadtman ER (1974) Regulation of glutamine synthetase in *E. coli*. In: Prusiner S, Stadtman ER (eds) Enzymes of glutamine metabolism. Academic Press, London New York, pp 9—43
6. Hill S (1976) Influence of atmospheric O₂ concentration on acetylene reduction and efficiency of N₂ fixation in *Klebsiella pneumoniae*. J Gen Microbiol 93:335—345
7. Keister DL (1975) Acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. J Bacteriol 123:1265—1268
8. Kurz WGW, LaRue T (1975) Nitrogen fixation activity in *Rhizobium* in absence of plant host. Nature 256:407—408
9. Ludwig RA (1980a) Regulation of *Rhizobium* nitrogen fixation by the unadelylated glutamine synthetase I system. Proc Natl Acad Sci USA 77:5817—5821
10. Ludwig RA (1980b) Physiological roles of glutamine synthetases I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp. 32H1. J Bacteriol 141:1209—1216
11. McComb JA, Elliott JJ, Dilworth MJ (1975) Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. Nature 256:409—410
12. Pagan J, Child JJ, Scowcroft WR, Gibson AH (1975) Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured in a defined medium. Nature 256:406—407
13. Tjepkema, Evans HJ (1975) Nitrogen fixation by *Rhizobium* in a defined liquid medium. Biochem Biophys Res Commun 65:625—628

16. ГЕНЫ НИТРОГЕНАЗЫ У RHIZOBIUM JAPONICUM

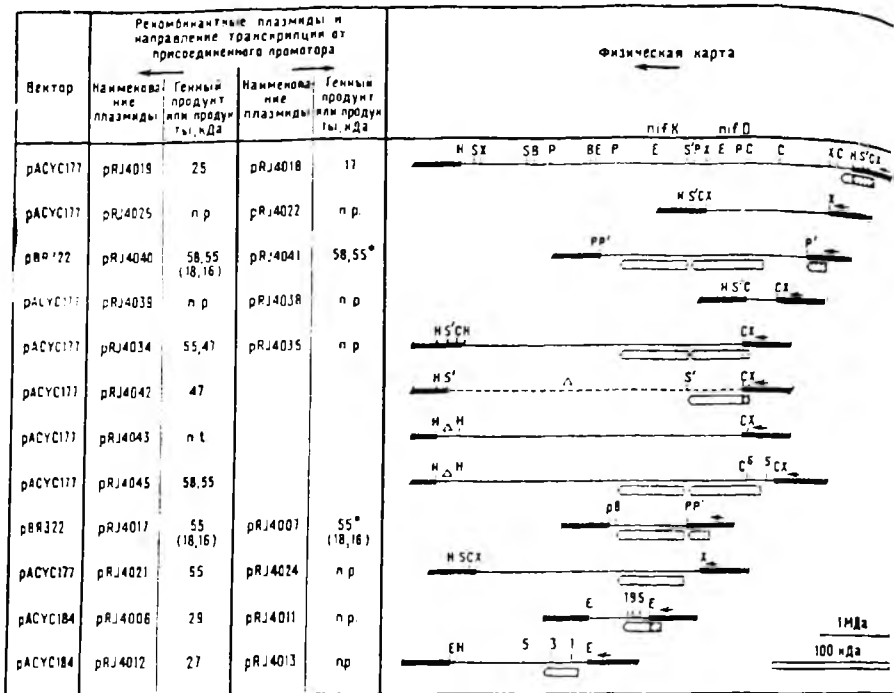
Г. ХЕННЕКЕ, М. ФУРМАН, М. ХАН, К. КАЛУЦА,
Б. РЕГЕНСБУРГЕР и Р. ВИРТ*

ВВЕДЕНИЕ

R. japonicum индуцирует формирование азотфиксирующих клубеньков у сои (*Glycine max*). Как и у всех других ризобий, анализ генов фиксации азота (*nif*) на молекулярном уровне у *R. japonicum* сдерживается тем, что получение *nif*⁻-мутантов средствами классической генетики затруднено. Еще одно препятствие при генетическом анализе *R. japonicum* представляет ее медленный рост. Указанные трудности частично компенсируются способностью некоторых штаммов депрессировать нитрогеназную активность в условиях свободного роста бактерий, поскольку данный уникальный признак облегчает проведение биохимических исследований полученных *nif*⁻-мутантов.

Наиболее успешным подходом к изучению *nif*-генов *R. japonicum* было применение методов генной инженерии. Используя гомологию ДНК нитрогеназных генов (*nifHDK*) *Klebsiella/Rhizobium* [8], мы смогли выявить аналогичные гены в банке клонов ДНК штамма *R. japonicum* 110 [2, 3]. Полученная рекомбинантная плазида (pRJ676) несет *Hind*III-вставку с молекулярной массой $5,3 \times 10^6$ в векторе pBR322. Межвидовой гибридационный анализ показал, что высокая степень гомологии наблюдается только в отношении гена *nifD* *Klebsiella*, с геном *nifH* она невелика, если вообще существует, а с геном *nifK* полностью отсутствует. В данной статье описаны результаты структурного анализа этих генов, полученные нами в последнее время. В частности, мы ставили перед собой следующие цели: 1) больше узнать о кодирующих свойствах клонированного участка; 2) подтвердить полученные ранее данные по межвидовой гибридизации, сопоставив нуклеотидные последовательности, и 3) найти способы применения клонированных генов для сайт-специфичного мутагенеза у *R. japonicum*.

* H. Hennecke, M. Fuhrmann, M. Hahn, K. Kaluza, B. Regensburger, and R. Wirth, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München, Maria-Ward-Str. 1a, 8000 München 19, BRD.



* Пролетивается слабо.

Рис. 16.1. Коллекция клонированных фрагментов ДНК *R. japonicum*, ведущих свое происхождение от pRJ676, и их генные продукты, синтезированные в мини-клетках *E. coli*. Во второй и четвертой колонках даны названия новых реконбирантных плазмид, в которых большинство фрагментов встроено в двух ориентациях относительно промотора гена устойчивости к антибиотику. В список не включены полные длины (интактных) генных продуктов, закодированных в соответствующих векторах, а также полипептиды, синтезируемые Tn5-мутационированными плазмидами. В скобках указаны укороченные белки, закодированные в векторах, и яркие фоновые белки мини-клеток. На физической карте даны названия только тех плазмид, которые приведены во второй колонке. Фрагменты ДНК *R. japonicum* (тонкие линии) с обеих сторон граничат с векторной ДНК, изображенной не полностью. Делеции (Δ) показаны пунктирной линией. У плазмид pRJ4034 и pRJ4012 клонированный фрагмент на крайнем левом конце содержит небольшой кусочек ДНК pBR322, происходящий от плазмиды pRJ676. Выражение генов начинается с промоторов, локализованных на правых концах клонированных фрагментов (обозначенных малыми стрелками, направленными влево). Положения Tn5-вставок отмечены пронумерованными кончиками стрелок. Генные продукты, закодированные в ДНК *R. japonicum*, изображены белыми полосками, тогда как заштрихованные участки полосок обозначают пептиды, определяемые сегментами генов устойчивости к антибиотикам. Рисунок представляет модификацию из работы [1]: сайты рестрикции: *EcoRI*(E), *PstI*(P), *SmaI*(S'), *BamHI*(B), *HindIII*(H), *ClaI*(C), *SalI*(S), *XhoI*(X). P' — существенного белка не обнаружено; n.t. — наличие генного продукта не проверялось.

ЭКСПРЕССИЯ КЛОНИРОВАННЫХ ГЕНОВ НИТРОГЕНАЗЫ В МИНИ-КЛЕТКАХ ШТАММА *E. COLI* DS410

Целью настоящего исследования был анализ генных продуктов, закодированных в ДНК *R. japonicum*, клонированной в плазмиде pRJ676. Мы надеялись преодолеть трудности, связанные с регуляцией и узнаванием промоторов, клонируя большое число субфрагментов pRJ676 в составе подходящих векторов (pBR322, pACYC184, pACYC177) таким образом, чтобы они транскрибировались с сильных промоторов генов устойчивости к антибиотикам. По возможности каждый фрагмент клонировали в двух ориентациях относительно внешнего промотора. Полипептиды, кодируемые рекомбинантными плазмидами, синтезировались затем в мини-клетках *E. coli* и идентифицировались в полиакриламидных гелях. Вместе с тем были использованы Tn5-инсерционные мутации для определения направления транскрипции, ее организации и точных сайтов терминции транскрипции генов.

На рисунке 16.1 представлены результаты проведенного анализа, а на рисунке 16.2 приведены некоторые примеры. Общее направление транскрипции — справа налево (рис. 16.1). Справа имеется сайт — сильный терминатор транскрипции. Сквозной транскрипции за этой точкой не наблюдалось, так что до участка, кодирующего следующий генный продукт, остается пропуск длиной 10^6 Да. Еще дальше по ходу трансляции мы локализовали единицу транскрипции, состоящую из двух цистронов, состоящую из двух генов, *nifD* и *nifK*. Эти гены кодируют соответственно β -субъединицу с молекулярной массой 58×10^3 Да и α -субъединицу 55×10^3 Да компонента I нитрогеназного комплекса *R. japonicum* [1]. На рисунке 16.2 оба белка



Рис. 16.2. Анализ ДСН-гель-электрофорезом (радиоавтография) ^{35}S -меченных экстрактов из мини-клеток: синтез белков нитрогеназы *R. japonicum*, направляемый плазмидой. Показаны полипептиды, кодируемые плазмидами pRJ4017 (a), pRJ4034 (b), pRJ4042 (c), pRJ4045 (d), pRJ4045::Tn5-6 (e). Буквами α и β указаны положения субъединиц компонента I нитрогеназы. Белки, обозначенные на правом поле, таковы: Tn5-кодируемые трансозоны (1a—1d) и аминокликозид-3 фосфотрансфераза II (3), а также кодируемый вектором предшественник (2a) и зрелая (2b) β -лактамаза.

видны на дорожке d (pRJ4045), α -субъединица также видна на дорожке a (pRJ4017) и b (pRJ4034), а укороченные производные β -субъединицы видны на дорожке b (pRJ4034) и c (pRJ4042). Вставка транспозона Tn5 вблизи начала гена *nifD* препятствует синтезу обеих субъединиц (дорожка e: pRJ4045::Tn5-6). Получены данные, свидетельствующие о существовании еще одной единицы транскрипции слева от оперона *nifDK*, цистрон которой, лежащий дистально относительно промотора, кодирует белок 27 кДа с неизвестной функцией.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

По данным гибридизации ДНК/ДНК, ген *nifD* *R. japonicum* проявляет высокую степень гомологии своему двойнику у *K. pneumoniae* [2]. Мы приступили к определению последовательности ДНК этого гена, чтобы найти объяснение подобной гомологии на молекулярном уровне. Мы воспользовались методом дидезокситерминации цепи Сэнгера и др. [9], используя фаги M13-mp7, -mp8 и -mp9, а также компьютером Apple II для обработки данных [7]. На рисунке 16.3 показан отрезок из 57 оснований, содержащийся в *EcoRI-ClaI*-фрагменте *nifD*-гена *R. japonicum*. Видна строгая гомология этого отрезка соответствующему сегменту *nifD* *K. pneumoniae*, который транслируется в цистеинсодержащий полипептид из 19 аминокислот. Из них 17 идентичны соответствующим аминокислотам *K. pneumoniae* [10] и 14 — аминокислотам триптического пептида, изолированного из компонента 1 *Azotobacter vinelandii* [5]. Последовательность Gly-Cys-Pro-Val-Gly-Leu-Ile уникальна для белков 4Fe:4S [5].

Нас также интересовала нуклеотидная последовательность участка, лежащего перед опероном *nifDK*. У *K. pneumoniae* здесь располагается ген *nifH*, кодирующий компонент 2 нитрогеназы. Межвидовая гибридизация ДНК/ДНК из этой области оказалась очень слабой и, видимо, не может служить доказательством лока-

NIF D-гомология

K.p.	GGG ATC ACC ATT CAG TCG GAA TGC CCG GTG GGG CTG ATC GGT GAT GAT ATC AGC GCG GLY ILE THR ILE GLN SER GLU CYS PRO VAL GLY LEU ILE GLY ASP ASP ILE SER ALA
R.j.	GGC TTT ACG ATA CAA TCA GAG TGC CCG GTA GCG TTG ATC GGT GAC GAT ATC GAG GCG GLY PHE THR ILE GLN SER GLU CYS PRO VAL GLY LEU ILE GLY ASP ASP ILE GLU ALA
A.v.	GLY ILE SER VAL GLN SER GLU CYS PRO ILE GLY LEU ILE GLY ASP ASP ILE GLU SER

*1) Scott et al., 1981.

**1) Lundell and Howard, 1981.

Рис. 16.3. Нуклеотидная последовательность высококонсервативного участка гена *nifD* *R. japonicum* (*R. j.*). Гомологичные последовательности *K. pneumoniae* (*K. p.*) и *A. vinelandii* (*A. v.*) помещены сверху и внизу.

лизации здесь гена *nifH* *R. japonicum* [2]. Более того, нам не удалось выявить выражение компонента 2 нитрогеназы *R. japonicum* в опытах с мини-клетками (рис. 16.1). Чтобы получить подтверждение или опровержение наличия гена *nifH* в указанном месте, был секвенирован сегмент ДНК длиной 1082 п. н. справа от *nifD*. Секвенированная ДНК была транслирована в 12 рамках считывания (по 6 на каждую цепь). Сравнение этих последовательностей с последовательностями из *nifH* *Klebsiella* [10, 12] не выявило какой-либо гомологии между ними на уровне как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей (здесь не показано). Следовательно, крайне маловероятно, что ген, аналогичный *nifH*, располагается в указанном районе.

В одном из опытов использовали некоторые одноцепочечные клоны данного участка в составе фага M13, чтобы определить кодирующую цепь посредством дот-гибридизации [7]. ³²P-Меченной пробой была мРНК, синтезированная *in vitro* в системе гомологичной транскрипции на фрагментах линейной ДНК этой области с помощью очищенной РНК-полимеразы из *R. japonicum*. Идентифицированная таким путем цепь ДНК транскрибируется в том же направлении, что и *nifDK*, и может кодировать либо два полипептида с молекулярными массами по 15×10^3 Да, либо, в случае ошибки секвенирования, приводящей к сдвигу фазы считывания, один полипептид 30×10^3 Да (данные не представлены).

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Рувкун и Аусюбель [8] дали общую схему локализованного мутагенеза у граммотрицательных прокариот. Его принцип заключается в мутировании клонированных фрагментов в *E. coli*, их обратном переносе в исходную бактерию и отборе замещения ДНК дикого типа на гомологичную мутированную ДНК. Мы сделали попытку приспособить эту методику для *R. japonicum*, воспользовавшись векторной системой, эффективно мобилизуемой в клетки ризобий, которая, однако, в них стабильно не поддерживается (Симон, в данном сборнике). После переноса Tn5-мутагенизированных фрагментов среди устойчивых к канамицину/неомицину эксконъюгантов можно выявить соответствующие мутанты.

На рисунке 16.4 показаны Tn5-мутагенизированные участки клонированной ДНК *R. japonicum*, которые были перенесены в устойчивый к спектиномицину Nod⁺Fix⁺-вариант штамма *R. japonicum* 110. Устойчивые к неомицину штаммы *R. japonicum* возникали с различной частотой. Суммарную ДНК таких штаммов затем расщепляли подходящими рестриктирующими ферментами, разделяли в агарозных гелях и анализировали блоттинг-гибридизацией по Саузерну [11]. В качестве радиоактивных проб для гибридизации были использованы следующие ник-транслированные ДНК [6]: вектор p201, *HpaI*-фрагмент транспозона Tn5, *EcoRI*-или *EcoRI-HindIII*-фрагменты из плазмиды pRJ676. «Истинный» Tn5-мутант *R. japonicum*, возникший в результате замещения мар-

Вектор	Наименование плазмиды	Физическая карта клонированных фрагментов	Частота переноса маркера устойчивости к неомицину	Наблюдаемое рекомбинантное событие		Обозначение трансконъюгантов, устойчивых к неомицину
				коинтеграция	замещение маркера	
pBR322	pRJ676					
p201	pRJ4079::Tn5-6		$3 \cdot 10^{-6}$	2	2	Штаммы A1-A4
p201	pRJ5201::Tn5-301		$5 \cdot 10^{-7}$	10	1	Штаммы B1-B11
p201	pRJ6201::Tn5-401		$1 \cdot 10^{-7}$	0	1	Штамм C1
p201	pRJ6000::Tn5-5		$2 \cdot 10^{-7}$	2	2	Штаммы D1-D4
p201	pRJ4029::Tn5-5		$2 \cdot 10^{-7}$	6	0	Штаммы E1-E6
p201	pRJ6201::Tn5-302		$5 \cdot 10^{-8}$	8	0	Штаммы F1-F8
p201	pRJ6000::Tn5-4		$2 \cdot 10^{-6}$	18	0	Штаммы G1-G18
p201	pRJ6201::Tn5-201		$1 \cdot 10^{-6}$	1	0	Штамм H1

Рис. 16.4. Сводка данных по локализованному мутагенезу клонированной *nif*-ДНК *R. japonicum*. *EcoRI* или *EcoRI-HindIII* фрагменты pRJ676 были встроены в мобилизуемый вектор p201. Названия новых плазмид помещены во второй колонке; каждая из них содержит Tn5-вставку с известным местоположением, указанным на физической карте кончиком стрелки. Все плазмиды переносили из донорного штамма *E. coli* Sm10 (Симон и др. в данном сборнике) в штамм *R. japonicum* 110sр^R посредством конъюгации. Устойчивые к неомицину экс-конъюганты *R. japonicum* получены с частотой, указанной в четвертой колонке. ДНК таких штаммов была исследована на наличие или отсутствие ДНК p201 с помощью гибридизации и последующего анализа, описанного в тексте: это помогло отличить штаммы, содержащие коинтеграта, от штаммов, в которых произошло действительное замещение маркера (пятая и шестая колонки).

кера в гомологичной ДНК, должен отвечать следующим требованиям: 1) Tn5-содержащий рестрикт должен обладать той же подвижностью, что и соответствующий фрагмент рекомбинантного клона; 2) должны отсутствовать немутированные фрагменты дикого типа; 3) не должны присутствовать остатки переносящего вектора. Как видно из данных на рисунке 16.4, лишь небольшая часть мутантов с Tn5-вставками в четырех различных положениях отвечает этим требованиям. У всех других штаммов преобладающим рекомбинационным событием, по-видимому, было совместное встраивание в геном гомологичной мутированной ДНК и векторной ДНК. В таких штаммах все еще присутствует одна копия фрагмента ДНК дикого типа (о чем свидетельствуют данные блоттинг-гибридизации по Саузерну, которые здесь не представлены). Частое образование коинтегратов, по-видимому, является неотъемлемым свойством использованной векторной системы.

Tn5-Содержащие *EcoRI*-фрагменты ДНК из двух «чистых» мутантов с замещенными маркерами, а именно из штаммов A3 и A4 (рис. 16.4), были вновь встроены в pACYC184. Tn5 оказался локализованным в тех же сайтах, что и в исходных рекомбинантных клонах (pRJ4029::Tn5-6 и pRJ6000::Tn5-5 соответственно). В на-

стоящее время изучаются фенотипы всех истинных мутантов с замещенными маркерами в отношении способности вызывать образование клубеньков и фиксацию азота.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Результаты, изложенные в настоящей статье, показывают, что структурные гены для α - и β -субъединиц компонента I нитрогеназы у *R. japonicum* организованы в одной единице транскрипции, опероне *nifDK*. У изучаемого организма, в отличие от *K. pneumoniae* или *R. meliloti* (Аусюбель и др. в данном сборнике), ген, аналогичный *nifH*, не входит в состав этого оперона; скорее всего, он локализован в другом месте генома. Подобная перестройка генов нитрогеназы относительно друг друга хотя и вызывает удивление, вероятно, не является редкостью: недавно было установлено, что у *Anabena variabilis* ген *nifK* отделен от *nifHD* (Р. Хазелькорн, личное сообщение).

Интересно также отметить, что в отличие от обнаруженных у *Klebsiella* взаимоотношений ген/белок [4] ген *nifD* у *R. japonicum* кодирует β -субъединицу компонента I большей длины, а *nifK* — α -субъединицу меньшей длины. Однако анализ последовательностей ДНК однозначно подтвердил гомологию генов *nifD*. Следовательно, эволюция допустила некоторую изменчивость длин отдельных субъединиц, не затронув консервативные структуры.

Наличие клонов физически охарактеризованной *nif*-ДНК *R. japonicum* в клетках *E. coli* дало возможность провести специфический мутагенез этой области. Получение мутантов *R. japonicum* посредством сайт-специфичного мутагенеза оказалось еще более трудоемким, чем у быстрорастущих штаммов ризобий [8]. Тем не менее существуют широкие возможности направленного получения *nif*-мутантов и выяснения физиологических функций генов, расположенных рядом с участком *nifDK*.

Благодарности. Мы признательны Р. Симону за предоставление бактериальных штаммов до опубликования результатов, И. Мессингу за составление компьютерной программы и А. Векку за помощь. Дотации для выполнения разных частей данной работы предоставлены Немецкой научно-исследовательской ассоциацией и Федеральным министерством по науке и технике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fuhrmann M, Hennecke H (1982) Coding properties of cloned nitrogenase structural genes from *Rhizobium japonicum*. Mol Gen Genet (in press)
2. Hennecke H (1981) Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes from *Rhizobium japonicum*. Nature 291:354—355
3. Hennecke H, Mielenz JR (1981) Molecular cloning of *Rhizobium japonicum* DNA in *E. coli* and identification of nitrogen fixation (*nif*) genes. In: Lyons et al (eds) Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen. Plenum Press, New York London, p 41
4. Kennedy C, Cannon F, Cannon M, Dixon R, Hill S, Jensen J, Kumar S, McLean P, Merrick M, Robson R, Postgate J (1981) Recent advances in the

- genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation. Australian Acad Sci, Canberra, p 146
5. Lundell DJ, Howard JB (1981) Isolation and sequences of the cysteinyl tryptic peptides from the MoFe-protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J Biol Chem* 256:6385—6391
 6. Maniatis T, Jeffrey A, Kleid DG (1975) Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1184—1188
 7. Messing J (1982) An integrative strategy of DNA sequencing and experiments beyond. In: Hollaender A, Setlow J (eds) Genetic engineering, principles and methods, vol IV. Plenum Press, New York London (in press)
 8. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
 9. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463—5467
 10. Scott KF, Rolfe GB, Shine J (1981) Biological nitrogen fixation: primary sequence of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* and *nifD* genes. *J Mol Appl Gen* 1:71—81
 11. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503—517
 12. Sundaresan V, Ausubel FM (1981) Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 256:2808—2812

17. СТРУКТУРА И ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ ЛЕГГЕМОГЛОБИНА У СОИ

К. МАРКЕР, К. БОЙСЕН, Э. ЕНСЕН, К. ПАЛУДАН
и О. ВИБОРГ*

ВВЕДЕНИЕ

Леггемоглобины (Lb) представляют собой миоглобиноподобные белки, синтезируемые исключительно в корневых клубеньках, развивающихся при симбиотической ассоциации *Rhizobium* с бобовыми растениями. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что их функция заключается в снабжении кислородом для дыхания бактериоидов в клубеньковой ткани [1]. Клубеньки у сои содержат 4 основных вида Lb, названных Lba, Lbc₁, Lbc₂ и Lbc₃ [5]. В небольших количествах в клубеньках обнаружено еще несколько Lb-компонентов, однако некоторые из них, скорее всего, являются посттрансляционными продуктами модификации основных компонентов. Различия в аминокислотном составе между Lb-компонентами невелики, не более 6—8 аминокислотных замен [13].

СЕМЕЙСТВО ЛЬ-ГЕНОВ

Леггемоглобины кодируются небольшим семейством генов в геноме растения [10, 14]. Активация этих генов происходит только после инфекции растения *Rhizobium*. Блоттинг по Саузерну *EcoRI*-расщепленной ДНК сои показал наличие семи фрагментов ДНК, гибридизующихся с пробой Lb-кДНК. Размеры этих фрагментов — 1,4; 4,2; 5,5; 6,0; 7,5; 10 и 12 т. п. н. К настоящему времени все семь фрагментов ДНК выделены из различных библиотек ДНК сои и для всех построены рестрикционные карты. Кроме того, завершено определение последовательности ДНК Lb-генов на пяти фрагментах. Анализ последовательностей фрагментов 4,2 и 1,4 т. п. н. показал, что оба они содержат неполные гены, причем фрагмент 4,2 т. п. н. несет 5'-конец, а фрагмент 1,4 т. п. н. — соответствующий 3'-конец гена. Фрагмент размером 5,5 т. п. н. содержит усеченный ген, включающий лишь 3'-конец. Фрагмент 6,0 т. п. н. содержит полный ген. Фрагменты 7,5 и 12 т. п. н. сцеп-

* K. A. Marcker, K. Bojsen, E. Ø. Jensen, K. Paludan and O. Wiborg. Department of Molecular Biology and Plant Physiology, University of Aarhus. 8000, Aarhus C, Denmark.

лены и включают два полных гена, по одному на каждый фрагмент, а также Lb-подобный ген, имеющий 5'-конец на фрагменте 7,5 т. п. н. и соответствующий 3'-конец на фрагменте 12 т. п. н. Фрагмент размером 10 т. п. н., вероятнее всего, содержит полный Lb-ген. Бриссон и Верма [4] изолировали также фрагмент размером 4,2 т. п. н., содержащий усеченный Lb-ген, который имеет лишь 3'-конец. Таким образом, семейство Lb-генов у сои состоит из пяти полных генов, одного Lb-подобного гена и по крайней мере двух усеченных генов.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК ЛЬ-ГЕНОВ

Завершен анализ первичных последовательностей ДНК Lb-генов, локализованных на фрагментах 1,4; 4,2; 6,0; 7,5 и 12 т. п. н. [8, 17]. Их сопоставление с известными аминокислотными последовательностями Lb-белков показало, что Lb-гены на фрагментах 6,0; 7,5 и 12 т. п. н. соответствуют леггемоглобинам Lbc₂, Lbc₁ и Lbc₃. Ген, локализованный на фрагментах 4,2 и 1,4 т. п. н., соответствует белку Lba. Ген, части которого находятся на фрагментах 7,2 и 12 т. п. н., соответствует Lb-подобному гену, который, скорее всего, представляет собой псевдо-Lb-ген.

Общая организация последовательностей ДНК, соответствующих генам Lba, Lbc₁, Lbc₂ и Lbc₃, изображена на рисунке 17.1. Кодрующие последовательности во всех случаях прерываются

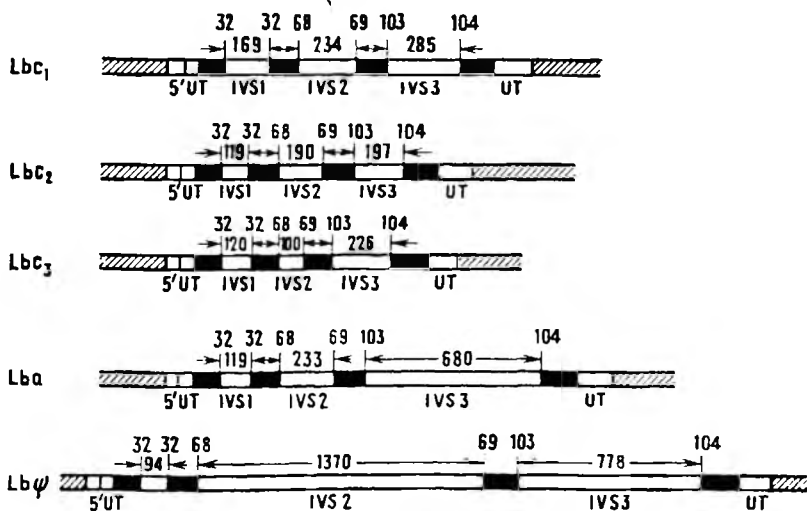


Рис. 17.1. Общая организация последовательностей ДНК пяти Lb-генов. Интроны обозначены IVS1, IVS2 и IVS3. Экзоны изображены черными полосками. Буквами UT обозначены нетранслируемые участки. Длины интронов указаны над полосками, а их локализация относительно порядковых номеров кодонов — под полосками. Последовательность ДНК гена Lbc₃ была определена также Бриссоном и Верма [4].

вездесущему гексануклеотиду ААТААА, который находится в сходном месте в других эукариотических генах, в которых он, по-видимому, служит сигналом для присоединения полиА [11]. Итак, предполагаемые регуляторные сигналы в Lb-генах очень похожи на соответствующие сигналы в других эукариотических генах. Это является сильным аргументом в пользу того, что механизм транскрипции генов у растений и других эукариот очень сходен.

СТРУКТУРА НЕОБЫЧНОГО Lb-ГЕНА

Общая организация последовательности ДНК Lb-подобного гена, расположенного на фрагментах 7,5 и 12 т. п. н., показана на рисунке 17.1. Положение интронов в данном гене такое же, как в других Lb-генах. Однако размеры IVS3 и особенно IVS2 значительно больше, чем у соответствующих последовательностей в других Lb-генах. Из-за увеличения их длины размер этого гена составляет около 3 т. п. н., что почти в два раза превышает размер нормального Lb-гена. Последовательности, лежащие вокруг сплайсинговых сочленений в данном гене, отвечают правилу Бретнаха—Шамбона [3]. Интроны не проявляют какой-либо гомологии с соответствующими последовательностями в других Lb-генах, за исключением последовательности вблизи сплайсинговых сочленений. Аминокислотная последовательность, выведенная исходя из кодирующей последовательности (рис. 17.3), хотя и обнаруживает 85% ную гомологию с белком Lbc₁, не соответствует какому-либо лег-

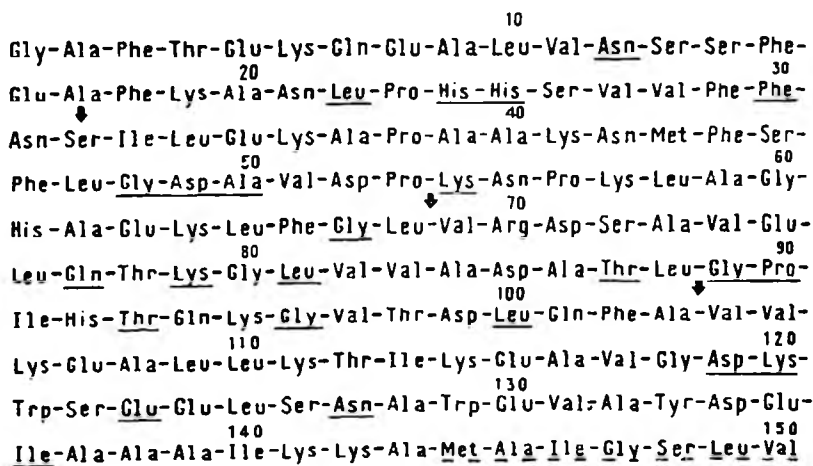


Рис. 17.3. Аминокислотная последовательность, выведенная на основе нуклеотидной последовательности Lb-подобного гена. Стрелками указаны местоположения интронов. *Сплошными линиями* подчеркнуты аминокислотные замены при сопоставлении с кодирующей последовательностью гена Lbc₁. *Пунктирной линией* подчеркнуты семь аминокислот, добавленных к 3'-концу. Бриссон и Верма [4] также определили последовательность ДНК, соответствующую экзонам 3 и 4 Lb-подобного гена.

гемоглобину сои. В этом необычном белке имеется 29 замещенных аминокислот, что на 20—25 аминокислот больше, чем в последовательностях других леггемоглобинов сои. К тому же в 3'-конце данного гена закодировано семь добавочных аминокислот. Третий экзон гена лишь на 79 % гомологичен соответствующему экзону в других Lb-генах. Этот экзон был встроен в фаг M13, и полученный в результате клон был использован для скрининга библиотеки клубеньковой кДНК сои, однако позитивных сигналов получено не было. Это указывает на то, что клубеньки сои не содержат соответствующей мРНК, или на то, что эта мРНК присутствует лишь в очень небольших количествах. Такой результат показывает, что данный особый ген нефункционален потому, что либо он не транскрибируется, либо его транскрипт слишком быстро оборачивается или не может транспортироваться. Наиболее правдоподобное объяснение состоит в том, что этот ген не транскрибируется, скорее всего, в результате мутаций в последовательностях, существенных для транскрипции. На рисунке 17.2 представлены последовательности, прилегающие к 5'-концам пяти Lb-генов. В Lb-подобном гене содержатся несколько мутаций в области кэп-сайта. Как показали недавно Токингтон и Ледер [15], этот участок существен для транскрипции β -глобиновых генов. Кроме того, Lb-подобный ген мутирован в участке, непосредственно предшествующем последовательности CCAAG. Гросвелд и др. [7] недавно установили, что данный участок также очень важен для транскрипции глобиновых генов. Итак, Lb-подобный ген содержит мутации в двух участках, предположительно существенных для транскрипции. Поэтому мы считаем, что этот ген нефункционален и, следовательно, является псевдогеном.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ЛЬ-ГЕНОВ НА ХРОМОСОМЕ СОИ

Вся область Lb-генов исследована с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну рестриктвов ДНК сои с применением специфических проб для разных Lb-генов. Дополнительно были получены клоны с перекрывающимися участками ДНК из нескольких геномных библиотек сои. Полученные до сих пор результаты показывают, что все Lb-гены сцеплены и что они содержатся в области генома длиной примерно 90 т. п. н., как изображено на рисунке 17.4. Клоны с перекрывающимися участками ДНК, подтверждающие локализацию гена на фрагменте 10 т. п. н. и усеченного гена на фрагменте 5,5 т. п. н., пока еще не получены. Тем не менее блоттинг по Саузерну ДНК сои свидетельствует о том, что местоположения этих генов указаны правильно. Четыре гена тесно сцеплены в последовательности 5'-Lba-Lbc₁-ψLb-Lbc₃-3'. Расстояния между ними составляют около 2,5—3 т. п. н. Однако расстояние между Lba-геном и Lb-геном, расположенным на фрагменте 10 т. п. н., равно примерно 25 т. п. н., тогда как Lbc₂ отстоит от усеченного гена на фрагменте 5,5 т. п. н. приблизительно на 15 т. п. н. Расстояние между генами Lbc₂ и Lbc₃ равно 25 т. п. н.

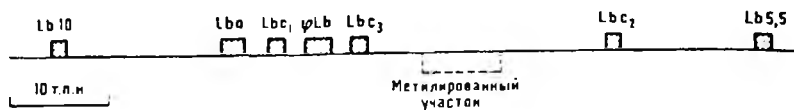


Рис. 17.4. Расположение Lb-генов на хромосоме. Заштрихованными прямоугольниками над сплошной линией изображены Lb-гены. Lb5,5 и Lb10 представляют Lb-гены, локализованные на соответствующих *EcoRI*-фрагментах 5,5 и 10 т. п. н. Пунктирным прямоугольником под сплошной линией обозначен участок, варьирующий по метилированию.

К сожалению, еще не завершен анализ последовательностей Lb-гена, расположенного на фрагменте 10 т. п. н., но, по имеющимся данным, этот ген функционален. Расположение Lb-генов на хромосоме сои может отражать порядок активации этих генов в процессе развития клубеньков [5, 16]. Отметим также, что между Lb-генами обнаружено несколько повторяющихся последовательностей. В настоящее время, однако, ничего не известно о природе этих последовательностей.

АКТИВАЦИЯ И МЕТИЛИРОВАНИЕ Lb-ГЕНОВ

Большинство активных эукариотических генов менее метилированы, чем соответствующие неактивные гены [12]. Это, по-видимому, справедливо и для Lb-генов. Действительно, блоттинг по Саузерну ДНК из клубеньков и проростков сои, расщепленной различными рестриктазами, показал, что область Lb-генов в ДНК из клубеньков менее метилирована, чем соответствующая область ДНК из проростков. Последовательности, обнаруживающие варьирование по метилированию, включают CCGG, CXG и CXXG. Следует указать, что различия по степени метилирования в области Lb-генов не наблюдаются, если ДНК, расщепленная нуклеазами *HpaII* или *MspI*, извлечена из одной и той же ткани. Однако *HpaII*- или *MspI*-рестрикты ДНК по области Lb-генов из проростков явно отличаются от аналогичных рестриктов ДНК из клубеньков. Так, в последовательностях CCGG в ДНК из семян оба C-остатка метилированы, тогда как в соответствующих последовательностях ДНК из клубеньков оба C-остатка деметилированы. Все сайты, варьирующие по метилированию, относятся к участку длиной 8 т. п. н., лежащему с 3'-стороны от гена Lbc₃ (рис. 17.4). Изучение варьирования по метилированию Lb-генов в процессе их активации еще не завершено. Поэтому представляется вероятным, что и другие участки рассматриваемой области Lb-генов обнаруживают изменчивость по степени метилирования, зависящей от состояния активации данных генов. Однако из полученных до сих пор результатов ясно, что активные Lb-гены менее метилированы, чем соответствующие неактивные гены, т. е. и в этом отношении Lb-гены аналогичны генам других эукариот.

Дополнение при корректуре. Дальнейший анализ показал, что *EcoRI*-фрагмент длиной 10 т. п. н. содержит псевдо-Lb-

ген и Lbc₂-ген. В ходе размножения фага псевдо-Lb-ген элиминируется, в результате чего образуется *EcoRI*-фрагмент размером 6 т. п. н., который содержит лишь ген Lbc₂. Было также показано, что шесть Lb-генов организованы в две независимые группы. Одна из них содержит четыре гена, расположенных в порядке 5'-Lb₁-Lbc₁-ψLb₂-Lbc₃-3', а другая — два гена в таком порядке: 5'-ψLb₁-Lbc₂-3'.

Благодарности. Мы хотели бы поблагодарить докторов Р. Гольдберга и Р. Фишера за предоставление библиотек ДНК сои, полученных с помощью рестриктаз *EcoRI* и *Alu/HaeIII*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Appleby CA (1974) In: Queispel A (ed) Leghemoglobin in the biology of nitrogen fixation. North-Holland Publ Comp, Amsterdam Oxford, pp 521-554
2. Bojsen K, Abildsten D, Jensen EO, Paludan K, Marcker KA (.) The chromosomal arrangement of six soybean leghemoglobin genes. EMBO J 2:1165-1168
3. Breathnach R, Benoist C, O'Hare K, Gannon F, Chambon P (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. Proc Natl Acad Sci USA 75:4853-4857
4. Brisson N, Verma DPS (1982) Soybean leghemoglobin gene family: normal, pseudo and truncated genes. Proc Natl Acad Sci USA 79:4055-4059
5. Fuchsman WH, Appleby CA (1979) Separation and determination of the relative concentration of the homogeneous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. Biochem Biophys Acta 579:314-324
6. Go M (1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. Nature 291:90-92
7. Grosveld GC, Rosenthal A, Flavell RA (1982) Sequence requirements for the transcription of the rabbit β-globin gene in vivo: the-80 region. Nucleic Acid Res 10:4951-4971
8. Hyldig-Nielsen JJ, Jensen EO, Paludan K, Wiborg O, Garrett R, Jørgensen P, Marcker KA (1982) The primary structures of two leghemoglobin genes from soybean. Nucleic Acids Res 10:689-701
9. Jensen EO, Paludan K, Hyldig-Nielsen JJ, Jørgensen P, Marcker KA (1981) The structure of a chromosomal leghemoglobin gene from soybean. Nature 291:677-679
10. Marcker KA, Gausing K, Jochimsen B, Jørgensen P, Paludan K, Truelson E (1981) The cloning and organization of soybean leghemoglobin genes. In: Panopoulos NJ (ed) Genetic engineering in the plant sciences. Praeger Publ
11. Proudfoot NJ, Brownlee GG (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263:211-214
12. Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. Science 210:604-610
13. Sievers G, Huhtala M-L, Ellfolk N (1978) The primary structure of soybean (*Glycine max.*). Acta Chem Scand B32:380-386
14. Sullivan D, Brisson N, Goodchild B, Verma DPS, Thomas DY (1981) Molecular analysis in soybean root nodules, characterization of the nascent and released peptide. Nature 289:516-518
15. Talkington CA, Leder P (1982) Rescuing the in vitro function of a globin pseudogene promoter. Nature 298:192-195
16. Verma CPS, Ball S, Guérin C, Wanamaker L (1979) Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules, characterization of the nascent and released peptides and the relative rates of synthesis of the major leghemoglobins. Biochemistry 18:476-483
17. Wiborg O, Hyldig-Nielsen JJ, Jensen EO, Paludan K, Marcker KA (1982) The nucleotide sequences of two leghemoglobin genes from soybean. Nucleic Acids Res 10:3487-3494

18. РОЛЬ ГЕНОВ РАСТЕНИЯ ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ СОИ С RHIZOBIUM

Д. ВЕРМА, Х. БЕРГМАН, Ф. ФУЛЛЕР и Э. ПРЕДДИ *

ВВЕДЕНИЕ

Способностью восстанавливать атмосферный азот наделены только прокариоты. Некоторые высшие растения в ходе эволюции приспособились к ассоциации с азотфиксирующими микроорганизмами, чтобы получать восстановленный азот. Подобные ассоциации варьируют от очень слабых (пример — колонизация ризосферы растений) до развития эндосимбиотического состояния [23, 24, 28]. Успешное взаимодействие между бобовым растением-хозяином и внедрившимся в него штаммом *Rhizobium* приводит к симбиотическому усвоению азота воздуха. Ассоциация бобовых с *Rhizobium* может представлять собой эндосимбиоз, при котором микросимбионт сохраняет автономность. Развитие такого симбиоза требует выражения ряда генов растения и бактерий, которое протекает, по-видимому, координированно. Результаты исследований, выполненных с различными мутантами растений и *Rhizobium*, свидетельствуют о том, что взаимодействия между этими организмами осуществляются на разных уровнях и характеризуются высокой степенью специфичности. Одни из таких взаимодействий могут быть общими для всех систем бобовые — *Rhizobium*, другие же — уникальны для взаимодействий в системе данного сорта/штамма.

Участие специфических генов хозяина в симбиозе

В развитие успешной ассоциации между бобовым растением и инфицировавшим его видом *Rhizobium* вовлечен ряд генов хозяина. Некоторые из них были идентифицированы [5, 16, 30] посредством классического генетического анализа. Мутации в таких генах приводят к Nod⁻фенотипу. Некоторые из подобных мутаций условны (т. е. клубеньки на растениях индуцируются одними бак-

* D. P. S. Verma, H. Bergmann, F. Fuller, and E. Preddie, Department of Biology, McGill University, 1205 Avenue Docteur Penfield, Montreal, Quebec, Canada H3A 1B1.

териальными штаммами и не индуцируются другими). Три рецессивных гена, которые влияют на разные этапы развития клубеньков, были идентифицированы у клевера [3]. Вместе с тем у растений имеются гены, контролирующие функционирование клубеньков после их внешне нормального развития [11, 16]. Степень изученности таких генов невелика (за исключением леггемоглобиновых генов), и их точные функции в симбиозе практически неизвестны.

Индукция генов хозяина в ходе формирования клубеньков

Индукция леггемоглобина происходит на несколько дней раньше, чем индукция нитрогеназной активности в клубеньках, и не зависит от ее появления. Леггемоглобиновые мРНК были выявлены уже через три дня после инфекции (Саттон, Маур и Верма, *неопубликованные данные*); они присутствуют в некоторых клубеньках, индуцированных мутантными штаммами [27] и не способных к эффективной фиксации азота. Вместе с леггемоглобиновыми генами индуцируется ряд других генов растения-хозяина, причем кинетика их индукции весьма сходна [26]. Во всех случаях степень индукции, по-видимому, зависит от специфики штамма *Rhizobium*. Это проявляется на уровне белков, так как набор белков хозяина в значительной мере изменяется мутантами *Rhizobium* [13, 15].

Идентификация специфичных для клубеньков генных продуктов растения-хозяина

Гены хозяина оказывают воздействие на ряд событий в ходе симбиоза, определяя способность к формированию клубеньков, их число, внутриклеточную организацию и дифференциацию, а также эффективность связывания азота [23, 24]. Мы идентифицировали [1, 10, 12, 13] ряд генных продуктов хозяина, которые индуцируются после инфекции сои бактериями *R. japonicum*. Подобные тканеспецифичные белки хозяина, нодулины, появляются параллельно с леггемоглобинами в ходе развития клубеньков [26], поэтому можно предположить, что они играют важную роль в симбиозе. Некоторые из таких белков были очищены и охарактеризованы в отношении их возможных функций.

Чтобы понять молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, мы попытались изолировать гены, кодирующие нодулины [10]. По библиотеке кДНК, полученных из клубеньковых мРНК, проведен поиск наиболее активно транскрибируемых, специфичных для клубеньков последовательностей после элиминации клонов леггемоглобиновых ДНК. Было получено несколько клонов, содержащих уникальные уровни ДНК, соответствующих от 0,6 до 6,5 % молекул мРНК клубеньков.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОДУЛИНОВ

Эффективность клубенька по связыванию азота может быть обусловлена как особенностями его структуры, так и активностью ферментов, обеспечивающих этот процесс. Была установлена определенная взаимозависимость между эффективностью клубеньков и фотосинтеза [4], что свидетельствует об участии основных ферментных систем тканей клубеньков в углеродно-азотном метаболизме.

В таблице 18.1 перечислен ряд ферментов, активность которых в тканях клубеньков может возрасти в несколько раз. Большая часть этих ферментов участвует в превращениях восстановленного азота в амиды или уреиды — две основные группы соединений, используемых для перемещения азота в корни растения. Кроме того, имеется несколько других ферментов, таких, как каталаза, карбоангидраза, леггемоглобинредуктаза и др., которые могут регулировать эффективность тканей при симбиотической фиксации азота. Некоторые нодулины могут быть этими ферментами.

Нодулины уже обнаружены в ряде ассоциаций бобовых растений с *Rhizobium* (например, у сои, бобов, гороха, клевера). Такие белки можно разделить на три класса: 1) структурные белки, 2) ферменты, ответственные за специфическую ассимиляцию восстановленного азота; 3) белки, обеспечивающие функции бактериоидов.

Эти белки существуют наряду с леггемоглобинами, которые можно отнести к специфическим для клубеньков белкам треть-

18.1. Возрастание содержания в клубеньках специфических ферментов и белков — предполагаемых кандидатов в нодулины

Фермент	Возрастание активности/ концентрации (в клубеньках/ в корнях)	Растение- источник	Литера- турный источник
Аллантоиназа	В 3 раза	Соя	[22]
Аспарагинсинтетаза	Несколько сот раз	Люпин	[20]
Аспаратаминотрансфераза	(Следует за нитрогеназой)	Соя	[29]
Каталаза	5—10	Соя	[8]
Карбоангидраза	12,5	Люпин	[6]
Глутаминсинтетаза	300—500	Люпин	[18]
Глутаматсинтаза	10	Люпин	[19]
Глутаматдекарбоксилаза	—	Клевер	[9]
Инвертаза	3—4	Соя	[21]
Леггемоглобинредуктаза	—	Соя	[17]
Фосфофруктокиназа	5	Люпин	[14]
ФЕП-карбоксилаза	3	Люпин	[6]
Уриказа	1,7/0	Соя	[22]
Ксантиноксидаза	0,014/0	Соя	[22]
Белки мембранной оболочки	Несколько раз	Соя	[25]

его класса. Вследствие отсутствия функциональных тестов для идентификации таких белков, попытки их очистить ограничивались констатацией того, что они присутствуют в большом количестве и тканеспецифичны.

Нодулин-35

Анализ цитоплазматических белков из эффективных корневых клубеньков сои выявил наличие большого количества белка с молекулярной массой 35 000, который был назван нодулином-35 [12]. Этот белок присутствует также во всех исследованных неэффективных клубеньках [12], хотя и в разных количествах. Следовательно, характер его индукции, вероятно, сходен с таковым леггемоглобина, который также присутствует в неэффективных клубеньках, но в гораздо меньших концентрациях [27]. Нодулин-35 составляет значительную часть в 0—30 %-ном сульфатаммонийном осадке из S100-препаратов клубеньков и может быть далее очищен пропусканием через ДЭАЭ-целлюлозу, поскольку он не связывается с этим ионообменником (рис. 18.1). Попытки выявить ферментативную активность привели к обнаружению в данной белковой фракции уриказной активности (урат: кислород оксидоредуктаза, К. Ф. 1.7.3.3). Иохимсен и Расмуссен (в данном сборнике) независимо предположили, что нодулин-35 представляет собой уриказу. Поскольку оптимальный pH и K_m уриказной активности, индуцируемой в клубеньках, сильно отличаются от аналогичных значений уриказной активности в других тканях сои [22], а сыворотка против нодулина-35 не дает перекрестной реакции с белками из корней или листьев [12], можно заключить, что этот фермент из клубеньков может быть новой формой, специфически вовлеченной в симбиотическую фиксацию азота.

Сходная ситуация наблюдается в случае глутаминсинтетазной активности в клубеньках фасоли [7].



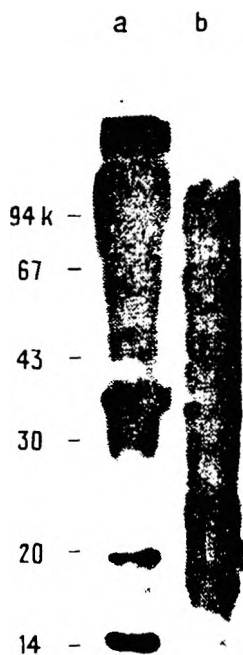
Рис. 18.1. ДСН-гель-электрофорез различных фракций белков в ходе очистки нодулина-35:

дорожка *a* — маркеры с известной молекулярной массой; *b* — суммарные цитоплазматические белки (S-100) из 21-дневных эффективных клубеньков сои; *c* — фракция, осажденная в 0—30 %-ном сульфате аммония; *d* — материал с дорожки *c*, который не связывается с ДЭАЭ-целлюлозой; *e* — материал, связавшийся с ДЭАЭ-целлюлозой и элюированный с помощью 0.5 М NaCl; *f* — материал, не связавшийся с ДЭАЭ-целлюлозой, пропущенный через СМ-целлюлозу.

Другие нодулины

Трансляция *in vitro* клубеньковых полисом в бесклеточной системе из проростков пшеницы с последующей иммунопреципитацией «клубеньковоспецифичной» антисывороткой [13] привела к выявлению ряда других специфичных для клубеньков белков растения-хозяина, по-видимому, участвующих в симбиозе. Эти белки обладают сравнительно низкой молекулярной массой (<20 000). Однако в аналогичном эксперименте с использованием лизата ретикулоцитов кролика и очищенной мРНК обнаружены нодулины, молекулярная масса которых варьирует от 120 000 до 20 000 (см. ниже). Поэтому создается впечатление, что полученные ранее результаты были обусловлены либо деградацией полисом в ходе трансляции, либо преждевременной терминацией растущих пептидов в бесклеточной системе из проростков пшеницы, либо протеолизом в процессе иммунопреципитации. Действительно, в меченой *in vivo* клубеньковой ткани были найдены специфичные для клубеньков пептиды с большей молекулярной массой (Легоцки, *неопубликованные данные*).

Попытки очистить эти белки, используя методы классической хроматографии, в отсутствие специфических функциональных тестов были малоуспешными. Однако, когда растворимые белки подвергли иммуноблоттингу с использованием антисывороток против белков из корней или клубеньков, было обнаружено несколько белков, которые, по-видимому, специфически накапливаются в клубеньковой ткани (рис. 18.2). Специфичные для клубеньков полипептиды, обнаруженные с помощью указанных методов, также имели более высокую молекулярную массу.



МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ НОДУЛИНОВЫХ ГЕНОВ

Анализ кинетики гибридизации РНК/кДНК вскрыл наличие умеренно обильного, специфичного для клубеньков класса РНК в дополнение к сверхобильному классу, в котором закодирован леггемоглобин [1, 2]. Поскольку

Рис. 18.2. Взаимодействие антиклубеньковой и антикорневой сывороток с фракцией цитоплазматических белков из клубеньков. Фракции белков, осажденных в 0–30%ном сульфате аммония, была подвергнута электрофорезу в ДСН-гелях, перенесена на нитроцеллюлозную бумагу и окрашена антиклубеньковой сывороткой (а) и антикорневой сывороткой (b).

появление данных РНК-последовательностей индуцируется параллельно с появлением леггемоглобиновых, был сделан вывод о том, что они кодируют нодулины [26]. Чтобы изолировать указанные последовательности, идентифицировать полипептиды, которые в них закодированы, и получить пробы для анализа нодулиновых генов, была создана библиотека кДНК из клубеньков сои. Анализ 5700 чувствительных к ампициллину клонов показал, что 13 % из них содержат последовательности, присутствующие в ткани корней, в то время как 37 % клонов содержат умеренно обильные, специфичные для клубеньков последовательности. Из последних

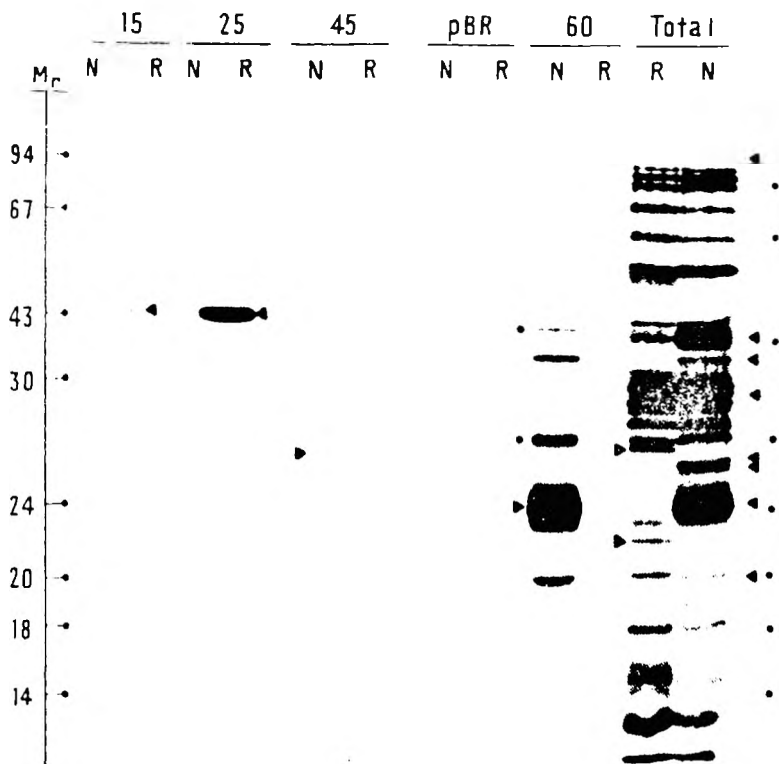


Рис. 183. Иммунопреципитация продуктов трансляции молекул мРНК, отобранных путем гибридизации с клонированными последовательностями ДНК. Продукты трансляции реагировали с антисыворотками, приготовленными против растворов суммарных белков из корней (R) или клубеньков (N), осаждались сефарозой с ковалентно припнитым белком А и подвергались электрофорезу. Другие иммунопреципитаты:

Total — продукты трансляции суммарных молекул полиА⁺-РНК из клубеньков; pBR — продукты трансляции макромолекул РНК, «отобранных» с помощью плазмиды pBR322; черные треугольники — продукты трансляции, специфически реагирующие с антиклубеньковой сывороткой; белые треугольники — продукты трансляции, специфически реагирующие с антикорневой сывороткой.

были выделены четыре нелеггемоглобиновых клона, представляющих три уникальные, специфичные для клубеньков последовательности.

Трансляция молекул мРНК, отобранных путем гибридизации с этими клонами, и последующая иммунопреципитация антителами против клубеньковых белков показали, что клонированные последовательности отбирают макромолекулы мРНК, кодирующие полипептиды с молекулярными массами 44 000, 27 000 и 24 000 (рис. 18.3). Такие полипептиды были обнаружены также в иммунопреципитатах продуктов трансляции суммарной клубеньковой мРНК. Один из клонов (#60), по-видимому, отбирал при гибридизации несколько других мРНК, дающих продукты трансляции, специфически преципитируемые антиклубеньковой сывороткой. Эти результаты показывают, что некоторые мРНК из клубеньков могут обладать частичной гомологией. Однако, поскольку данный клон гибридизуется лишь с одним геномным *EcoRI*-фрагментом [10], подобная перекрестная гомология должна быть ограниченной.

Продукты трансляции суммарной клубеньковой полиА⁺-мРНК были также обработаны антикорневой сывороткой (рис. 18.3). Были обнаружены два полипептида (с молекулярными массами 22 000 и 29 500), которые в тканях корня, по-видимому, представлены в большем количестве, чем в тканях клубеньков. Несколько полипептидов (с молекулярными массами 120, 44, 41, 36, 27,5, 27, 24 и 20 кДа) реагировали с клубеньковой, но не реагировали (или слабо взаимодействовали) с корневой антисывороткой.

Блоттинг-гибридизация по Саузерну геномной ДНК сои с нодулиновыми ДНК-клонами показала, что в отличие от леггемоглобина, который кодируется близкородственным семейством последовательностей, нодулины кодируются генами, представленными единственными копиями. Мы изолировали некоторые из таких последовательностей из геномной библиотеки сои.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Результаты генетического и молекулярного анализа позволяют с достаточным основанием предполагать, что в симбиоз бобовых растений с *Rhizobium* вовлечены несколько специфичных для клубеньков генов. У сои был идентифицирован ряд генных продуктов хозяина, которые индуцируются в процессе инфекции и развития корневых клубеньков. Эти тканеспецифичные белки, нодулины, появляются параллельно с леггемоглобинами. Их индукция происходит до появления нитрогеназной активности в клубеньковой ткани и независимо от нее. Очистка и изучение свойств одного из нодулинов, нодулина-35, показали, что он обладает уриказной активностью. Последняя локализована в пероксисомах и участвует в метаболизме уреидов. Другие нодулины представлены относительно небольшой фракцией растворимых цитоплазматических белков растения-хозяина, и их очистка оказалась поэтому более сложной задачей. Ее можно облегчить, получив моноклональные антитела против указанных белков (работа в этом направлении ведется).

Молекулярное клонирование специфичных для клубеньков последовательностей показало, что в дополнение к леггемоглобиновым мРНК имеется еще одна обильно представленная последовательность, составляющая почти 6,5 % общей полисомной мРНК в клубеньках [10]. Данный транскрипт может быть частью сверхобильного класса, представляющего 18 % массы клубеньковой мРНК, которая, как считалось ранее, состоит из леггемоглобиновой РНК [2]. Присутствие такого транскрипта в большом количестве должно быть существенно для развития симбиоза в корневых клубеньках. Однако продукт трансляции этой мРНК, молекулярная масса которого 44 000, не очень обилён в растворимой фракции клубеньковых белков.

Понимание функций клубеньковоспецифичных генов и характера их регуляции после инфекции растения *Rhizobium* имеет фундаментальное значение для манипуляций симбиозом такого рода. Наличие индивидуальных молекулярных проб для клубеньковоспецифичных последовательностей позволило бы выделить и детально охарактеризовать как эти гены, так и специфические регуляторные элементы, ответственные за их индукцию. Информация, касающаяся организации нодулиновых генов на хромосоме и их локализации относительно леггемоглобиновых генов, также была бы полезна для понимания их координированной индукции после инфекции растения клетками *Rhizobium*. Подобный анализ может облегчить выделение мутантов растений и бактерий, у которых затронута специфическая стадия развития клубеньков.

Благодарности. Данная работа субсидировалась дотациями Научного совета Канады по естественным наукам и технике, а также Министерством образования провинции Квебек.

ЛИТЕРАТУРА

1. Auger S, Verma DPS (1981) *Biochemistry* 10:1300—1306
2. Auger S, Baulcombe D, Verma DPS (1979) *Biochem Biophys Acta* 563:496—509
3. Bergersen FJ, Nutman PS (1957) *Heredity* 11:175—184
4. Bethelmalvaay GJ, Aubu-shakra SS, Phillips DA (1978) *Plant Physiol* 62:127—130
5. Caldwell BE, Vest HG (1977) In: Harey RWF, Silver WS (eds) *A treatise on dinitrogen fixation*. Wiley Interscience, New York, pp 557—576
6. Christeller JT, Laing WA, Sutton WD (1977) *Plant Physiol* 160:47—50
7. Cullimore JV, Lara M, Lea PJ, Mifflin BJ (1983) *Planta* 157:245—253
8. Francis AJ, Alexander M (1972) *Can J Microbiol* 18:861—864
9. Freney JR, Gibson AH (1975) *Aust J Plant Physiol* 2:663—668
10. Fuller F, Künstner P, Nguyen T, Verma DPS (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80 2594—2598
11. Holl FB (1973) *Can J Genet Cytol* 15:659
12. Legocki RP, Verma DPS (1979) *Science* 205:190—193
13. Legocki RP, Verma DPS (1980) *Cell* 20:153—163
14. Melongoy K, Elkan GH (1977) *J Bacteriol* 131:179—187
15. Noel DK, Stacey G, Tandon SR, Silver LE, Brill WJ (1982) *J Bacteriol* 152:485—494
16. Nutman PS (1981) In: Gibson AH, Newton WE (eds) *Current perspectives in nitrogen fixation*. Aust Acad Sci, Canberra, pp 194—204

17. Puppo A, Rigaud J, Job D (1980) *Plant Sci Lett* 20:1—6
18. Robertson JG, Farnden KJ, Warbuton MP, Bank JM (1975a) *Aust J Plant Physiol* 2:265—272
19. Robertson JG, Warburton MP, Farnden KJF (1975b) *FEBS Lett* 55:33—37
20. Scott DB, Farnden KJF, Robertson JG (1976) *Nature* 263:703—705
21. Streeter JG (1977) *Plant Physiol* 60:235—239
22. Tajima S, Yamamoto Y (1975) *Plant Cell Physiol* 16:271—282
23. Verma DPS (1982) In: Smith H, Grierson D (eds) *The molecular biology of plant development*. Blackwell Sci Publ, Oxford, pp 437—466
24. Verma DPS, Long S (1983) In: Jeon K (ed) *International review of cytology*, Suppl 14. Academic Pres, London New York, pp 211—245
25. Verma DPS, Zogbi V, Bal AK (1978) *Plant Sci Lett* 13:137—142
26. Verma DPS, Legocki RP, Auger S (1981a) In: Gibson AA, Newton WE (eds) *Current perspectives in nitrogen fixation*. Aust Acad Sci, Canberra, pp 205—208
27. Verma DPS, Hougland R, Brisson N, Legocki R, Lacroix L (1981b) *Biochem Biophys Acta* 653:98—107
28. Vose, Ruschel (1981) In: *Associate nitrogen fixation*. CRC Press
29. Werner D, Mörschel E (1978) *Planta* 141:169—177
30. Weber CR (1966) *Agronomy J* 58:43—46

19. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ФИКСАЦИЮ АЗОТА У RHIZOBIUM PHASEOLI

Р. ПАЛАСИОС, К. КИНТО, Х. ДЕ-ЛА-ВЕГА,
М. ФЛОРЕС, Л. ФЕРНАНДЕС, М. ЭРНАНДЕС,
Т. БАЛЪЯДО и Г. СОБЕРОН-ЧАВЕС *

Для идентификации и изучения генов азотфиксации (*nif*-генов) у *R. phaseoli* мы придерживались экспериментального подхода, основанного на чрезвычайно высокой степени гомологии последовательностей ДНК, кодирующих полипептиды нитрогеназы у разных видов бактерий, способных связывать молекулярный азот [6, 7, 11]. В настоящей статье мы приводим обзор экспериментальных данных, полученных в нашей лаборатории, на основании которых мы пришли к следующим выводам: 1) *nif*-гены у *R. phaseoli* организованы по общему для *Rhizobium* плану; 2) последовательности ДНК, относящиеся к *nif*-генам, у *R. phaseoli* повторяются; 3) последовательности эти локализованы в плазмидах.

Чтобы вывести общее заключение об организации *nif*-генов у *R. phaseoli*, мы решили исследовать штаммы *Rhizobium* различного географического происхождения. Для блоттинг-гибридизации по Саузерну [13] продуктов *EcoRI*-расщепления геномной ДНК из различных штаммов в качестве пробы была взята *EcoRI*-вставка из плазмиды рSA30. Эта вставка содержит последовательности ДНК, кодирующие полипептиды нитрогеназы *Klebsiella pneumoniae* [2]. У разных тестируемых нами штаммов *R. phaseoli* выявлено три полосы гибридации. Две полосы фрагментов ДНК с размерами 4,7 т. п. н. (полоса а) и 4,1 т. п. н. (полоса б) являются общими для всех штаммов. Третья полоса (с) дает менее интенсивный сигнал гибридации и содержит фрагменты ДНК с характерной длиной либо 5,2 т. п. н. (два штамма), либо 4,5 т. п. н. (девять штаммов), либо 3,6 т. п. н. (один штамм). Результаты этих экспериментов представлены на рисунке 19.1. Результаты, полученные ранее в других лабораториях [8, 11] относительно характера гибридации *nif*-генов *R. phaseoli* с аналогичными генами *K. pneumoniae*, согласуются с изложенными здесь данными. Напротив, результаты опытов, проведенных с *Rhizobium*, обладающими другим спектром хозяев [7, 8, 11], включая *R. meliloti*,

* R. Palacios, C. Quinto, H. De La Vega, M. Flores, L. Fernández, M. Hernández, T. Ballado, and G. Soberón-Chávez, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Ap. postal 565-A, Cuernavaca, Mor., Mexico.

ность организации *nif*-генов. Однако для окончательного вывода необходимо проанализировать большее число штаммов, особенно штаммов с более широким спектром хозяев.

Показано, что у *R. meliloti* последовательности ДНК, которые в жестких условиях гибридизируются с *nif*-генами *K. pneumoniae*, представляют собой непрерывный участок длиной 1,6—2,2 т. п. н., содержащий гены *nifH* и *D* [3, 11]. У *R. phaseoli* соответствующие последовательности характеризуются более сложной организацией, в связи с чем можно сделать несколько предположений: а) ДНК *R. phaseoli* гибридизуется с более обширными последовательностями ДНК *Klebsiella*; б) последовательности ДНК *R. phaseoli*, гибридизующиеся с ДНК *Klebsiella*, расположены не в одном участке, подобно тому как это имеет место у синезеленой водоросли *Anabaena* [6]; в) последовательности ДНК *R. phaseoli*, которые гибридизуются с *nif*-генами *Klebsiella*, дуплицированы.

Для выяснения общей организации последовательностей ДНК *R. phaseoli*, гибридизующихся с *nif*-генами *Klebsiella*, ДНК одного из штаммов клонировали в *EcoRI*-сайте вектора pBR328 [12]. Были изолированы рекомбинантные плазмиды, которые содержат вставки, соответствующие полосам с участками ДНК а (4,7 т. п. н.), б (4,1 т. п. н.) и с (4,5 т. п. н.), и использованы для гибридизации с расщепленной геномной ДНК различных штаммов *R. phaseoli*. Каждая из вставок (а, б или с) гибридизуется с тремя полосами, дающими положительную реакцию с *nif*-генами *Klebsiella*. Пример использования вставки а в качестве пробы приведен на рисунке 19.1. Вставки а и б дают сильный сигнал гибридизации с полосами а и б, ведущими происхождение из различных штаммов, и менее интенсивный сигнал с полосой с. С другой стороны, вставка с дает интенсивный сигнал гибридизации с полосой с других штаммов.

Изложенные результаты показывают, что во вставках содержатся последовательности ДНК, которые повторяются в геноме проанализированных штаммов. Альтернативным объяснением может быть то, что мы имеем дело с бактериальными популяциями, имеющими различное строение последовательностей ДНК в разных клетках. Последнее маловероятно, поскольку специальные опыты, проведенные с отдельными клонами бактериальных клеток, дали такие же результаты. Следовательно, если представленные данные объясняются полиморфизмом строения ДНК, то одновременно следует предположить существование постоянно идущих перестроек генов *R. phaseoli*.

Результаты предварительных экспериментов (здесь не представленные) по гибридизации фрагментов вставки *K. pneumoniae* с различными вставками *R. phaseoli* показывают, что ДНК полосы а и б содержит гены *nifH* и *D*, тогда как ДНК полосы с несет только ген *nifH*. С другой стороны, данные по секвенированию ДНК показали наличие кодирующей последовательности гена *nifH* в каждой из трех полос *R. phaseoli*. Пока, однако, не ясно, содержат ли разные повторяющиеся последовательности функциональ-

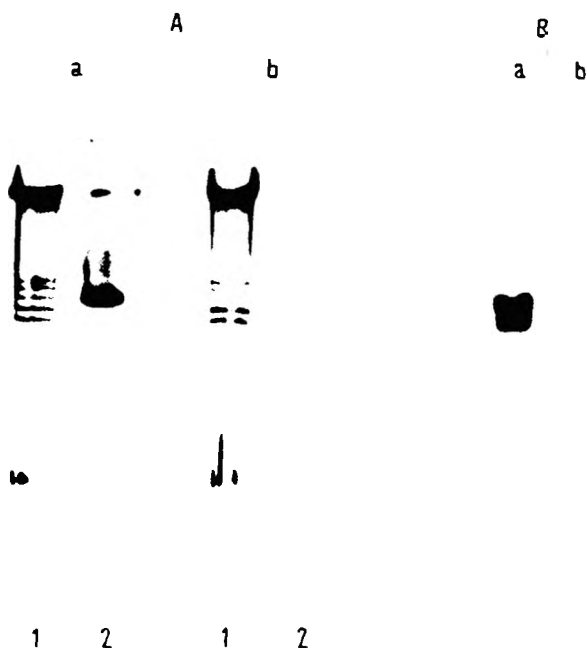


Рис. 19.2. А, В. Локализация разных повторов *nif*-ДНК на одной плазмиде. Штамм CFN-Rph-42 был подвергнут тепловому воздействию, в результате чего выделен под-штамм, у которого отсутствовала плаزمиды с (с молекулярной массой 170×10^6):

а — штамм дикого типа; б — исцеленный штамм; А — профили плазмидной ДНК: 1 — окрашивание бромистым этидием; 2 — гибридизация с *nif*-клоном а (5, 7 т. п. п.) *R. phaseoli*; В — блоттинг-гибридизация по Саузерну суммарной ДНК, расщепленной *EcoRI*, с ДНК *nif*-клона а.

ные гены. Хорошо известно, что по крайней мере некоторые *nif*-гены *Rhizobium*, принадлежащих в отношении специфичности к хозяину к разным группам, локализованы на крупных плазмиды [1, 4, 8, 10]. Мы установили, что каждая из трех вставок *R. phaseoli* способна к гибридизации со специфическими плазмиды из разных штаммов. Кроме того, как показано на рисунке 19.2, у одного из штаммов, излеченного тепловым воздействием от плазмиды с молекулярной массой 170×10^6 , больше не обнаруживается гибридизации с продуктами расщепления плазмид или целого генома при использовании в качестве пробы *nif*-последовательности ДНК *R. phaseoli*. Это означает, что по крайней мере у данного штамма все повторяющиеся *nif*-последовательности локализованы на одной плазмиде. Этот излеченный штамм потерял также способность индуцировать клубеньки у *P. vulgaris*, следовательно,

гены, ответственные за образование клубеньков, локализованы у него на той же плазмиде. О локализации генов, контролирующих образование клубеньков у *R. phaseoli*, на плазмиде впервые сообщили Лэм и др. [5].

Описанные здесь результаты свидетельствуют о сложной организации *nif*-последовательностей ДНК у *R. phaseoli*, что противоречит предположению о более простой организации *nif*-генов, сделанному на основании данных, полученных в других лабораториях, работавших с другими видами *Rhizobium* (см. статьи Денардые и др., Аусюбеля и др., Пюлера и др., Дитта и др., Джонстона и др., Шайна и др. в данном сборнике). Наш подход позволил отыскать некоторые последовательности ДНК, которые повторяются в геноме *R. phaseoli* трижды. Однако не были обнаружены повторы с одними и теми же сайтами рестрикции. Поиск микрогетерогенности в изучаемых последовательностях ДНК и примыкающих к ним участках, равно как и эксперименты по встраиванию генетических элементов (транспозонов) в различные участки плазмид и генома бактерий, будут способствовать выяснению истинного числа и длин повторяющихся областей, а также установлению различий по данному признаку между *Rhizobium*, принадлежащими к разным группам. Стабильные дубликации генов нечасты в бактериальных системах [9]. Обнаружение повторов в высокой степени консервативных *nif*-последовательностях ДНК у *R. phaseoli* побуждает к выяснению истинной роли, которую играет организация генов подобного типа.

Благодарности. Данная работа частично субсидировалась дотациями Национального совета по науке и технике, а также Научно-исследовательским фондом им. Х. Севады (Мексика).

ЛИТЕРАТУРА

1. Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981) Mol Gen Genet 184:318—325
2. Cannon FC, Riedel GE, Ausubel FM (1989) Mol Gen Genet 174:59—66
3. Corbin D, Ditta G, Helinski DR (1981) J Bacteriol 149:221—229
4. Hombrecke G, Brewing NJ, Johnston AWB (1981) Mol Gen Genet 182:133—136
5. Lamb JW, Hombrecke G, Johnston AWB (1982) Mol Gen Genet 186:449—452
6. Mazur BJ, Rice D, Haselkorn R (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77
7. Nuti MP, Lepidi AA, Praksh RK, Schilperoort RA (1979) Nature 282:533—535
8. Prakash RK, Schilperoort RA, Nuti MP (1981) J Bacteriol 145:1129—1136
9. Riley M, Anilionis A (1978) Annu Rev Microbiol 32:519—560
10. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Mol Gen Genet 184:326—333
11. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:191—195
12. Sobéron X, Covarrubias L, Bolivar F (1980) Gene 9:287—305
13. Southern EM (1975) J Mol Biol 98:503—517

20. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ФИКСАЦИЮ АЗОТА И ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ, НА КРУПНОЙ ПЛАЗМИДЕ ИЗ ШТАММА RHIZOBIUM sp. С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ

К. ПЭНКХЕРСТ **, У. БРАУТОН *, К. БАХЕМ *,
Э. КОНДОРОШИ *** и А. КОНДОРОШИ **

ВВЕДЕНИЕ

Трудности, встречаемые при изучении инфекционных свойств ризобнальных видов, огромны. Некоторые быстрорастущие ризобии, например штаммы *R. trifolii* или *R. meliloti*, имеют ограниченный круг хозяев, тогда как другие, например медленнорастущие ризобии, часто встречающиеся в клубеньках тропических видов бобовых, «неразборчивы» и способны индуцировать клубеньки и связывать азот в ассоциации с широким кругом бобовых растений [13]. Штаммы *Rhizobium* последнего типа предположительно содержат гены, определяющие широкий спектр хозяев.

Установлено, что быстрорастущий штамм *Rhizobium* NGR234 (=МРІК3030), выделенный из *Lablab purpureus*, индуцирует образование эффективно связывающих азот корневых клубеньков у ряда тропических видов бобовых, имеющих, как полагали ранее, лишь медленнорастущих симбионтов [11]. Установлено, что этот штамм индуцирует клубеньки у небобового растения *Parasponia andersonii* [12]. Следовательно, МРІК3030 сочетает такие ценные свойства, как высокая скорость роста и широкий круг хозяев, благодаря которым он представляет огромный интерес для молекулярно-генетического анализа. Поэтому конечной целью изучения штамма *Rhizobium* sp. МРІК3030 было охарактеризовать гены, контролирующие образование клубеньков (*nod*), и гены, определяющие широкий круг растений-хозяев.

* W. J. Broughton, C. Bachem, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Abteilung Schell, 5000 Köln 30, BRD.

** C. E. Pankhurst, Applied Biochemistry Division, D.S.I.R., Palmerston North, New Zealand.

*** E. Kondorosi, Institute of Biochemistry, Biol. Res. Cts., Hung. Acad. Sci. P. O. Box 521, 6701 Szeged, Hungary.

** A. Kondorosi, Institute of Genetics, Biol. Res. Cts., Hung. Acad. Sci. P. O. Box 521, 6701 Szeged, Hungary.

Круг хозяев штамма МРІК3030

Тринк [11] исследовал способность МРІК3030 индуцировать клубеньки и фиксировать азот в симбиозе с несколькими видами бобовых из тропического и умеренного поясов, представляющих основные группы перекрестной инокуляции. Мы продолжили эту работу.

Все, что известно в настоящее время относительно круга хозяев указанного штамма, сведено в таблице 20.1. В дополнение к способности индуцировать формирование клубеньков Nod⁺Fix⁺ на ряде тропических видов бобовых МРІК3030 образует клубеньки Nod⁻Fix⁺ на *Glycine max*, обычным симбионтом которой является *R. japonicum*. МРІК3030 оказался неспособным индуцировать клубеньки у хозяев, относящихся к группам перекрестной инокуляции лотоса (*Lotus pedunculatus*), люпина (*Lupinus angustifolius*), клевера (*Trifolium pratense*), гороха (*Pisum sativum*) и фасоли (*Phaseolus vulgaris*) (табл. 20.1). На растениях *Medicago sativa* МРІК3030 иногда индуцировал образование опухолей, похожих на клубеньки. Такие опухолеподобные структуры могут достигать больших размеров (3—5 мм в диаметре) (Пэнкхерст, *неопубликованные данные*).

Плазмидный состав клеток МРІК3030

С помощью электрофореза в агарозном геле по Экхарду [1] было установлено, что МРІК3030 содержит одну крупную плазмиду (рис. 20.1, а). Путем сравнения подвижности этой плазмиды и

20.1. Круг хозяев штамма *Rhizobium* sp. МРІК3030

Растения-хозяева	Фенотип клубеньков	Литературный источник
Бобовые		
<i>Calopogonium caeruleum</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Desmodium intortum</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	В данном сборнике
<i>Flemingia congesta</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Glycine max</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Lablab purpureus</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	В данном сборнике
<i>Stylosanthes hamata</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	В данном сборнике
<i>Tephrosia candida</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Vigna unguiculata</i>	Nod ⁺ Fix ⁺	[11]
<i>Arachis hypogaea</i>	Nod ⁺ Fix ⁻	В данном сборнике
<i>Lotus pedunculatus</i>	Nod ⁻	В данном сборнике
<i>Lupinus angustifolius</i>	Nod ⁻	[11]
<i>Medicago sativa</i>	Nod ⁻	В данном сборнике и [11]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nod ⁻	[11]
<i>Pisum sativum</i>	Nod ⁻	[11]
<i>Trifolium pratense</i>	Nod ⁻	[11]
Небобовые		
<i>Parasponia andersonii</i>	Nod ⁺ Fix ⁻	[12]

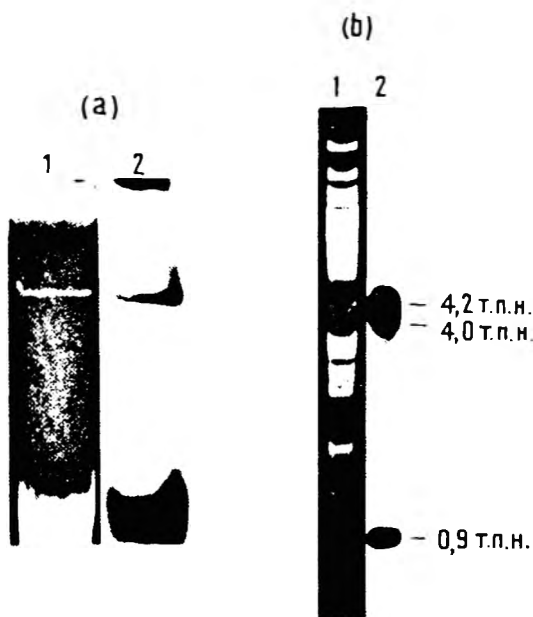


Рис. 20.1, а, б. Выявление крупной плазмиды в клетках штамма *Rhizobium* sp. МРІК3030:

а — гель Экхарда, в котором обнаруживается рМРІК3030а (дорожка 1), и гибридизация рМРІК3030а с рІD1 (дорожка 2); б — агарозный гель, в котором разделены продукты *Eco*RI-рестрикции плазмиды рМРІК3030а (дорожка 1), и гибридизация этих *Eco*RI-рестрикттов с рІD1 (дорожка 2). Указаны размеры *Eco*RI-фрагментов, гибридизующихся с рІD1.

плазмид известной молекулярной массы, подвергнутых электрофорезу в одном и том же геле, молекулярная масса МРІК3030 была оценена в 310 ± 20 МДа.

Наличие генов *nif* на рМРІК3030а

Для установления наличия генов фиксации азота (*nif*) на плазмиде рМРІК3030а мы провели блоттинг геля Экхарда с рМРІК3030а и гибридизацию с 32 P-меченной пробой (рІD1), содержащей гены *nifH* и *nifD* штамма *R. meliloti* 41 [1]. Как показано на рисунке 20.1, а, наблюдалась сильная гибридизация между пробой и изучаемой плазмидой, что свидетельствовало о присутствии *nif*-генов на этой плазмиде.

Выделение рМРІК3030а

Попытка препаративного выделения плазмиды рМРІК3030а с помощью метода щелочной денатурации [2] оказалась безуспешной из-за высокой молекулярной массы этой плазмиды. Поэтому мы воспользовались методом, подробно описанным Розенбергом и др. [8], включающим процедуру лизиса клеток по Швингхамеру [10]. С помощью этого метода удалось выделить рМРІК3030а в количестве 5—10 мкг ДНК/л культуры в ранней логарифмической фазе (от 5×10^7 до 1×10^8 клеток/мл).

Продукты расщепления рМРІК3030а под действием *EcoRI* эффективно гибридизовались с пробой рІD1 (рис. 20.1, b), это свидетельствует о том, что на изучаемой плазмиде находятся *nif*-последовательности. Гибридирующий участок состоит из трех *EcoRI*-фрагментов размером 4,2; 4,0 и 0,9 т. п. н. (рис. 20,1, b).

КЛОНИРОВАНИЕ рМРІК3030а В СОСТАВЕ КОСМИДНОГО ВЕКТОРА рJB8

Космида рJB8 представляет собой модифицированный вариант космидного вектора *Гомер 1* [5]. Ее длина 5,4 т. п. н., она была сконструирована для того, чтобы преодолеть два основных препятствия, встречающихся на пути космидного клонирования: 1) образование космид, содержащих несмежные вставки ДНК, и 2) возникновение космид, несущих множественные векторы и множественные вставки [5]. Космида рJB8 имеет два *EcoRI*-сайта, разделенных *BamHI*-линкером, в который можно встроить фрагменты ДНК — продукты частичного расщепления рестриктазами *MboI* и *Sau3A*. Встроенную ДНК можно вырезать из космидного вектора с помощью *EcoRI*.

Очищенная ДНК рМРІК3030а была клонирована в рJB8 в соответствии с методами, предложенными Иш-Хоровицом и Бурке [5]. В клетках штамма *E. coli* HB101 (*hsd R⁻ rec A⁻*) был создан космидный банк, состоящий из 120 индивидуальных гибридных космидных клонов плазмиды рМРІК3030а. Воспользовавшись процедурой «минипреп» для выделения космид из клеток HB101 [5] и расщепив космидную ДНК с помощью *EcoRI*, мы показали, что размеры вставок рМРІК3030а в отдельных космидах варьируют от 32 до 47 т. п. н. Поскольку общая длина рМРІК3030а оценивается в 462 т. п. н., то можно рассчитать, что вся плаزمида должна заключаться в 50 случайно отобранных космидных клонах.

Космидная карта плазмиды рМРІК3030а

Космидные клоны, несущие *nif*-гены, были идентифицированы по методу гибридизации колоний, описанному Иш-Хоровицом и Бурке [5], с помощью гибридизационной пробы рІD1. Затем были отобраны два клон, содержащих участки *nif*, отличающиеся по картине *EcoRI*-расщепления. Космидную ДНК из этих двух клонов выделяли по методике «минипреп» (с увеличением масштаба в 40 раз) и очищали центрифугированием в растворе CsCl с бромистым этидием. ДНК метили ³²P ник-трансляцией и использовали как пробу для гибридизации с ДНК из 50 космидных клонов, которую готовили по методике «минипреп», расщепляли рестриктазой *EcoRI* и фиксировали на двух наборах нитроцеллюлозных фильтров. Таким путем удалось идентифицировать космидные клоны, гибридизующиеся с пробами. Космиды, у которых гибридизацию с пробой проявляли лишь 2—3 фрагмента, были отобраны и использованы для приготовления следующей гибридизационной

пробы. Повторяя этот процесс, нам удалось установить порядок чередования последовательностей ДНК, содержащихся в индивидуальных космидах, вдоль 50 % длины рМРІК3030а.

Локализация под-области на рМРІК3030а

Мы изучили возможность использования клонированных участков мегаплазмиды рRme41b из штамма *R. meliloti* 41 (AK631) [1] в качестве гибридизационных проб для идентификации на плазмиде рМРІК3030а области, контролирующей образование клубеньков (*nod*). При гибридизации очищенной ДНК рМРІК3030а с суммарной ДНК штамма AK631 обнаружилось большое число гибридизационных полос (рис. 20.2). При гибридизации с суммарной ДНК штамма *R. meliloti* AK1329 (мутант AK631 с делецией по области *nod* — *nif*) некоторые из гибридизационных полос, присутствовавших в случае штамма AK631, отсутствовали (рис. 20.2, дорожки 1 и 2). Полосы, отсутствовавшие в случае штамма AK1329, возможно, содержат гены *nif* и *nod*, делетированные у AK631. Поэтому представлялось вероятным, что между рRme41b и рМРІК3030а существует достаточная гомология, чтобы использовать клонированные фрагменты рRme41b в качестве гибридизационных проб для локализации *nod*-участка на плазмиде рМРІК3030а. На рисунке 20.2 представлены также результаты гибридизации рМРІК3030а с суммарной ДНК из *A. tumefaciens* (LBA288), *R. trifolii* (LPR5001) и различными трансконъюгантами этих штаммов [4]. Несколько слабых гибридизационных полос было получено при такой гибридизации с ДНК LBA288 (рис. 20.2,

дорожка 3), производный штамм LBA288, содержащий рRtr5a (Sym-плаزمида из LPR5001), дал несколько новых интенсивных гибридизационных полос (рис. 20.2, дорожка 4). Штамм *R. trifolii*



Рис. 20.2. Гибридизация рМРІК3030а EcoRI-рестриктированной суммарной ДНК штамма *R. meliloti* AK631 (дорожка 1), *R. meliloti* AK1329 (дорожка 2), *A. tumefaciens* LBA288 (дорожка 3), LBA2702 — штамм, производный от LBA288, содержащий рRtr5a — Sym-плазмиду из штамма LPR5001 (дорожка 4), *R. trifolii* LPR5001 (дорожка 5), LPR5054 — штамм, производный от LPR5001, вылеченный от рRtr5a (дорожка 6), LPR5041 — штамм, производный от LPR5054, в который была внесена рRtr5a (дорожка 7). Стрелками обозначены гибридизационные полосы, характерные для AK631, но не для AK1329.

LPR5001 (рис. 20.2, дорожка 5) дал несколько интенсивных гибридационных полос, тогда как вылеченный тепловым воздействием производный штамм LPR5001, не содержащий *pRtr5a*, дал слабую гибридацию (рис. 20.2, дорожка 6). Повторное внесение *pRtr5a* в клетки указанного вылеченного производного штамма (LPR5041, рис. 20.2, дорожка 7) восстановило его гибридационные свойства. Полученные данные означают, что интенсивная гибридация ДНК этих бактериальных штаммов с *pMPIK3030a* связана с присутствием плазмиды *pRtr5a*. Представляет интерес также значительная гомология между *pMPIK3030a* и АК631. Было сконструировано несколько *R'*-производных плазмиды R68.45, содержащих различные участки *pRme41b* (Кондорози и др. в данном сборнике). Две из таких *R'*-плазмид, *pGR1* и *pGR3*, содержащие участки плазмиды *pRme41b* длиной 160 и 88 т. п. н. соответственно, несут гены *nif* и *nod*, судя по их способности восстанавливать фенотип *Nod⁺Fix⁻* у АК1329. При использовании двух данных *R'*-плазмид в качестве гибридационных проб для анализа космидного банка *pMPIK3030a* была обнаружена их гибридация с клонами ДНК, содержащими гены *nif*, а также с несколькими другими клонами (рис. 20.3).

Были выявлены две обширные области гибридации между *pGR1*, *pGR3* и космидной картой *pMPIK3030a*. Первая область протяженностью около 15 т. п. н. содержит *nif*-гены, определенные с помощью *pID1* (рис. 20.3). Вторая область, покрывающая около 25 т. п. н. и установленная с помощью клонов *pC2* и *pC10* (рис. 20.3), располагается на расстоянии примерно 15 т. п. н. слева от *nif*-области. Наблюдалась еще гибридация *pGR1* с участком, лежащим слева от этой области (с клонами *pC30* и *pC16*). Данные по гибридации между *pGR3* и космидными клонами *pC1*, *pC2* и *pC10* представлены на рисунке 20.4.

Хотя прямые данные отсутствуют, есть два косвенных указания на локализацию *nod*-функций в участке, определяемом кло-

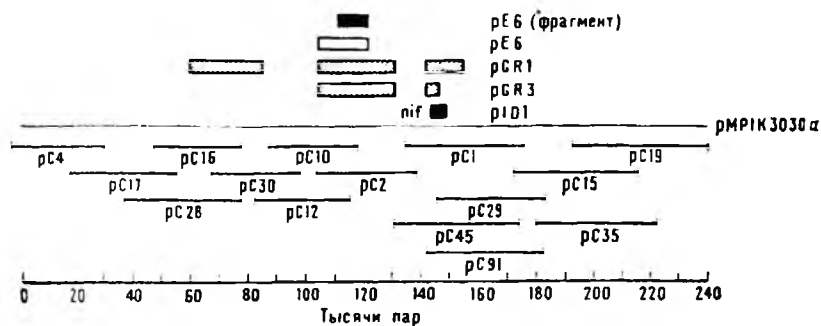


Рис. 20.3. Карта части плазмиды *pMPIK3030a* длиной 240 т. п. н., на которой указаны участки ДНК, содержащиеся в различных космидных клонах, и картина гибридации плазмид *pID1*, *pGR3*, *pGR1* космиды *pE6* и фрагмента *pE6* длиной 9,0 т. п. н. с указанными клонами.

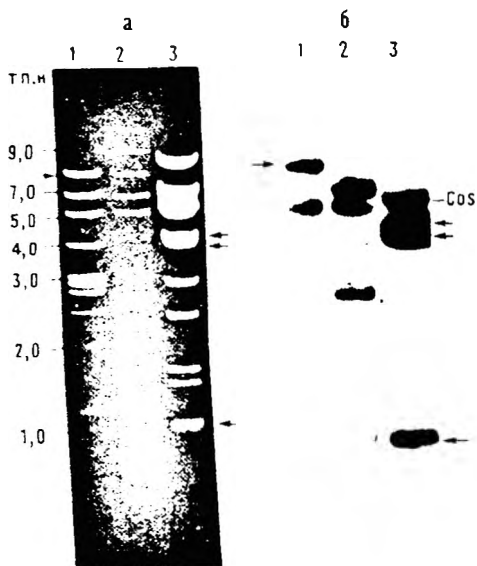


Рис. 20.4, а, б. Гибридизация R'-плазмиды pGR3 *R. meliloti* с *EcoRI*-рестриktированной ДНК трех космидных клонов рМРІК3030а. а. *EcoRI*-рестриktированная ДНК клона рС1 (дорожка 1), рС2 (дорожка 2) и рС1 (дорожка 3). Маленькими стрелками указаны три *EcoRI*-фрагмента клона рС1, который содержит *nif*-гены. Большой стрелкой указан фрагмент 7,7 т. п. н. клона рС10, гибридирующий также с фрагментом 9,0 т. п. н. космиды рЕ6 (который, возможно, содержит *nod*-гены *R. meliloti*). Указан также фрагмент 5,4 т. п. н. космидного вектора рJB8, содержащийся в каждом клоне

нами ДНК рС2 и рС10. Во-первых, гибридизационные данные, полученные с участием клонов рGR1 и рGR3, показывают, что наряду с областью *nif*-генов обе R'-плазмиды эффективно гибридизуются с участком рМРІК3030а, содержащимся в клонах рС2 и рС10. Так как обе R'-плазмиды восстанавливают способность штамма АК1329 формировать клубеньки и фиксировать азот, естественно предположить, что данный участок может содержать гены *nod*. Во-вторых, наблюдалась гибридизация между космидами рС10 и рС2 и космидным клоном штамма *R. meliloti* АК63, несущим *EcoRI*-фрагмент 9,0 т. п. н., который, как полагают, включает гены *nod* (Кондороши и др. в данном сборнике) (рис. 20.3). Эта космида, рЕ6, содержит вставку ДНК размером 30 т. п. н., отстоящую примерно на 18 т. п. н. от гена *nifD* в плазмиде рRme41b (Кондороши и др. в данном сборнике). При использовании рС10 в качестве гибридизационной пробы против *EcoRI*-рестриktированной ДНК рЕ6 была обнаружена сильная гибридизация между рС10 и фрагментом 9,0 т. п. н. из рЕ6 (данные не приведены). Гибридизация рестриktированной ДНК рС10 с фрагментом 9,0 т. п. н. из рЕ6 свидетельствует о высокой степени гомологии между этим фрагментом и наибольшим (7,7 т. п. н.) фрагментом рС10 (рис. 20.4).

Дополнительные доказательства в пользу локализации *nod*-генов на участке космидной карты рМРІК3030а, определяемом клонами рС10 и рС2, вытекают из генетических данных, полученных

другими исследователями, показавшими, что гены *nod* и *nif* тесно сцеплены у *R. meliloti* [1, 7] (Кондороши и др. в данном сборнике), *R. leguminosarum* (Джонстон и др. в данном сборнике) и *R. trifolii* (Шайн и др. в данном сборнике). Следует также упомянуть, что последовательности ДНК, содержащиеся в космидном клоне, способном комплементировать *Nod*⁻мутант штамма *R. meliloti* 1021, находятся в пределах 30 т. п. н. от *nif*-локусов со стороны гена *nifD* на участке структурных генов нитрогеназы [6].

ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТКА *nif* ПЛАЗМИДЫ рМРІК3030а

Область *nif* плазмиды рМРІК3030а, определяемая по гибридизации с клонами ДНК рІD1, рGR1 и рGR3, содержит три *EcoRI*-рестрикционных фрагмента размером 4,2; 4,0 и 0,9 т. п. н. (рис. 20.1 и 20.4). Гибридизация рІD1 с ДНК клонов, содержащих гены *nif* рС1, рС45 и рС91, подвергнутых расщеплению различными рестриктазами, указала на отсутствие сайтов для ферментов *HindIII*, *KpnI*, *SmaI* и *BglII* и наличие одиночных сайтов для *BamHI* и *SalI* в пределах рассматриваемой области *nif*. Чтобы выяснить, который из упомянутых трех *EcoRI*-фрагментов включает ген *nifD* и (или) *nifH*, были изолированы индивидуальные фрагменты рІD1, несущие *nifD* (*SmaI*-фрагмент длиной 2,2 т. п. н.) и *nifH* (*HindIII*-фрагмент длиной 2,1 т. п. н.) [1], и использованы как гибридизационные пробы против *EcoRI*-рестриктированной ДНК рС1 и рС45. Результаты получились неопределенными, поскольку обе пробы гибридизовались со всеми тремя *EcoRI*-фрагментами. Однако аналогичная гибридизация с *BamHI*-рестриктированной ДНК рС1 и рС45 показала, что *nifD*-проба гибридизовалась с двумя фрагментами (7,5 т. п. н. и 2,1 т. п. н.), а *nifH*-проба — лишь с фрагментом 7,5 т. п. н. (данные не представлены). К тому же клон рС29, несущий вставку ДНК, конец которой находится в пределах *nif*-области (рис. 20.3), не содержит *BamHI*-фрагмента 2,1 т. п. н., гибридизующегося с *nifD*. Из этих данных можно предварительно заключить, что ген *nifD* расположен слева от *nifH*. Такой же порядок расположения гена *nifD* (слева от *nifH*) установлен и для *nif*-области у *R. meliloti* [1, 9] и *R. japonicum* [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентифицирован участок генов *nif* и предположительно *nod* в космидных кломах единственной крупной плазмиды из штамма *Rhizobium* sp. МРІК3030 с широким спектром хозяев. Участок генов *nod* был идентифицирован посредством гибридизации с ДНК двух R'-плазмид и космиды *R. meliloti*, кодирующей функции *nod*; он локализован на плазмиде рМРІК3030а на расстоянии 25 т. п. н. слева от участка *nif*.

1. Bnfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1982) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:318—325
2. Csse F, Poucher C, Julliot JS, Michel H, Dénarié J (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 113:229—242
3. Ehrmann M, Hennecke H (1982) Coding properties of cloned nitrogen fixation structural genes from *Rhizobium japonicum*. *Mol Gen Genet* 187:419—425
4. Hooykaas PJJ, Brussel AAN Van, Dulk-Ras H Den, Slogteren GMS Van, Hilperoorst RA (1981) Sym-plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291:351—353
5. In-Horowicz D, Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res* 9:2989—2998
6. Long SR, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature* 298:485—488
7. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
8. Rosenberg C, Casse-Delbart F, Dusha I, David M, Boucher C (1982) Megaplasmids in the plant-associated bacterium *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J Bact* 150:402—406
9. Suvkun GB, Sundaresan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559
10. Schwinghamer EA (1980) A method for improved lysis of some Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* 7:157—162
11. Trinck MJ (1980) Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lotus purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J Appl Bacteriol* 49:39—53
12. Trinck MJ, Galbraith J (1980) The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross-inoculation group concept of legumes. *New Phytol* 86:17—26
13. Vincent JM (1974) Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: Quispel A (ed) *The biology of nitrogen fixation*. Elsevier/North Holland Publ. Co., Amsterdam, pp 265—341

21. ИДЕНТИФИКАЦИЯ, МОБИЛИЗАЦИЯ В ШИРОКИЙ КРУГ ХОЗЯЕВ И МУТАГЕНЕЗ КОИНТЕГРАТИВНОЙ ПЛАЗМИДЫ RHIZOBIUM TRIFOLII Sym.:R68.45

К. РОНСОН* и Д. СКОТТ**

ВВЕДЕНИЕ

Наблюдения, показавшие, что признаки инфекционности (Nod⁺) и эффективности (Fix⁺) у определенных штаммов *R. trifolii* нестабильны, привели к предположению, что данные симбиотические свойства детерминируются плазмидами. В недавно опубликованных статьях было продемонстрировано наличие у некоторых штаммов *Rhizobium* крупных плазмид и подтверждена способность плазмид кодировать гены симбиоза (см. обзор [7]).

В данной статье мы рассматриваем идентификацию симбиотической плазмиды pRtr514a у нестабильного штамма *R. trifolii*. Эта плазида была мобилизована в форме коинтегративной плазмиды pPN1 плазмидой широкого круга хозяев (R68.45) [18] и перенесена в клетки штаммов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и различных видов *Rhizobium* [16]. Здесь описано также ее влияние на симбиотические свойства других видов ризобий и использование штамма *E. coli*/pPN1 для проведения транспозонного мутагенеза изучаемой плазмиды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и среды

Характеристики бактериальных штаммов приведены в таблице 21.1. Штамм *R. trifolii* PN165 был получен из штамма NZP561 после теплового воздействия, осуществленного, как описано Скоттом и Ронсоном [18]. По плазмидным профилям каких-либо различий между штаммами PN165 и NZP561 не выявлено. Среда TY, синтетическая среда S10 и питательная среда Оксонд описаны ранее [15, 16, 18].

* C. W. Ronson, Grasslands Division and Applied Biochemistry Division, Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston North, New Zealand.

** D. B. Scott, Applied Biochemistry Division, Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston North, New Zealand.

21.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм	Свойства штамма	Происхождение штамма или литературный источник
<i>Rhizobium trifolii</i>		
NZP514	Nod+Fix+	Коллекция культур ДНПИ
NZP597	Nod-	Спонтанный мутант штамма NZP514
PN100	Nod+Fix+ <i>str-1 rif-1</i>	Спонтанный мутант штамма NZP514
PN104	Nod- <i>str-1 rif-1</i>	Излеченный тепловым воздействием вариант штамма PN100
PN109	Nod+Fix+ <i>kan-1</i>	Спонтанный мутант штамма NZP514
PN116	Nod+Fix+R68.45	Вариант штамма NZP514
PN118	Nod-5 <i>fur-1</i>	Спонтанный мутант штамма NZP597
PN150	Nod+Fix+5 <i>fur-1</i> /pPN1	Данная работа
NZP561	Nod+Fix+	Коллекция культур ДНПИ
PN165	Nod-	Излеченный тепловым воздействием вариант штамма NZP561
NZP596	Nod+Fix+	Коллекция культур ДНПИ
<i>R. leguminosarum</i>		
3841	Nod+Fix+ <i>str-277</i>	[3]
NZP5471	Nod+Fix+	Коллекция культур ДНПИ
<i>R. phaseoli</i>		
NZP5097	Nod+Fix+	То же
<i>R. loti</i>		
NZP2037	Nod+Fix+ (<i>L. pedunculatus</i>)	»
NZP2213	Nod+Fix+ (<i>L. tenuis</i>)	»
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>recA</i> r ⁻ m ⁻	Г. Дитта
PN200	HB101/pPN1	Данная работа
PN205	HB101::Tn7	Вариант штамма HB101
PN206	HB101::Tn7/pPN1	Вариант штамма PN205
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA02003	<i>rec-2</i>	[5]
PN203, PN204	PA02003/pPN1	Данная работа
PA01162	r ⁻ m ⁺	
Плазмиды		
pRtr514a	Nod+	[18]
R68.45	KmTcCblncP	[9]
pPN1	pRtr514a::R68.45	Данная работа и [18]

* Департамент научных и промышленных исследований (ДНПИ), Отдел прикладной биологии, Пальмерстон-Норт, Новая Зеландия.

Скрещивания

Скрещивания выполняли на стерильных миллипоровых фильтрах, как было описано ранее [16, 18]. После инкубации фильтров в течение ночи на чашке со средой TY бактерии, выросшие на фильтре, суспендировали, промывали, разбавляли и затем высевали на подходящие селективные среды (S10-агар, содержащий

траклин, для ризобияльных реципиентов; питательный агар Оксид с добавкой канамицина для реципиентов *E. coli*; питательный агар Оксид с добавкой карбенициллина для реципиентов *P. aeruginosa*). Транскоњуанты очищали четырьмя циклами штриховых посевов из одной колонии, если не оговорено особо. Частоту переноса определяли как отношение числа транскоњуантов к общему числу реципиентных клеток.

Тесты на растениях

Тесты на растениях *Trifolium pratense*, *T. repens*, *Lotus pedunculatus*, *L. tenuis* и *Medicago sativa* проводили, используя проростки, выращенные в пробирках 150×19 мм на косяках агара Енсена для проростков [16, 19]. Тесты на *Pisum sativum* и *Phaseolus vulgaris* выполняли в стеклянных банках на 500 мл, наполненных стерильной увлажненной пемзой, как было описано ранее [16]. Пробирки и банки после инокуляции помещали в ростовую камеру. Эффективность штаммов *Rhizobium* оценивали, сравнивая ростовую реакцию инокулированных и неинокулированных (контрольных) растений, а способность к связыванию азота определяли по тесту на восстановление ацетилен. Ризобий выделяли из клубеньков, как было описано ранее [18].

Выделение плазмид и электрофорез в агарозном геле

Бактерий выращивали в бульоне ТУ до поглощения при длине волны 600 нм около 0,4. Клетки из 150 мкл культуры (для штаммов *E. coli*/pPN1) или из 1 мл культуры (для других штаммов) однократно промывали 0,1 %-ным (вес/объем) саркозином в буфере 50 мМ трис-20 мМ ЭДТА (рН 8,0); получение грубых лизатов клеток и электрофорез проводили по методу Экхарда [8], модифицированному Розенбергом и др. [17], за исключением того, что процедуры выполняли при 14 °С. Гели окрашивали и фотографировали, как описано ранее [18].

Другие методы

Методы, применявшиеся для излечения бактерий от плазмид, для изучения скручивания корневых волосков, а также электронное микроскопирование клубеньков были описаны ранее [15, 18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Происхождение плазмиды pPN1

Было известно, что штамм *R. trifolii* NZP514 при длительном хранении выщепляет Nod⁻-варианты (Р. Гринвуд, личное сообщение). При сопоставлении плазмидных профилей одного из Nod⁻-

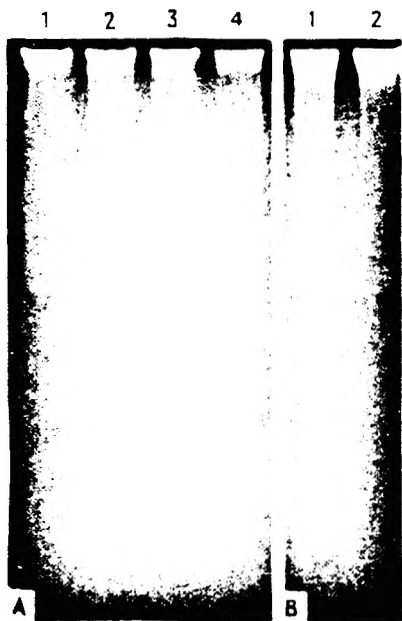


Рис. 21.1. А, В. Электрофоретический анализ плазмид штаммов *R. trifolii*, *E. coli* PN200 в агарозном геле:

А: дорожка 1 — штамм *R. trifolii* NZP597; дорожка 2 — штамм NZP597; дорожка 3 — *Nod*⁺-трансконъюгант из скрещивания PN116 × PN118; дорожка 4 — штамм *E. coli* PN200; В: дорожка 1 — штамм *R. trifolii*, полученный после хранения штамма PN200; дорожка 2 — штамм PN150.

производных штамма NZP597 и штамма NZP514 было установлено, что у штамма *Nod*⁻ отсутствует самая маленькая плазмида имеющаяся у штамма дикого типа (рис. 21.1, дорожки 1 и 2). Эта плазмида с молекулярной массой 180 МДа, получившая название pRtr514a, отсутствовала также у *Nod*⁻-производных NZP514, полученных тепловым воздействием. Такие *Nod*⁻-производные не способны индуцировать скручивание корневых волосков у белоглазого клевера, что указывает на участие pRtr514a в контроле одного из ранних этапов формирования корневых клубеньков.

Чтобы подтвердить предположение о том, что pRtr514a действительно несет гены симбиоза, были предприняты попытки к переносу с помощью различных доноров детерминанта *Nod*⁻ штамм PN104, являющийся *Str*^R*Rif*^R-производным штамм NZP514, излеченного тепловым воздействием от pRtr514a. Если донором был генетически маркированный (*Can*^R) штамм PN109 производный NZP514, то реципиентные бактерии не индуцировали клубеньки. Контрольные опыты показали, что достаточно всего лишь 10 колониеобразующих единиц (к. о. е.) PN109 для индукции клубеньков при инокуляции в присутствии 10⁸ к. о. е. штамм PN104. Следовательно, частота переноса *Nod*⁺ из PN109 в PN104 < 10⁻⁷, т. е. pRtr514a не способна к самостоятельному переносу.

Однако если в качестве донора использовали штамм PN116, производный NZP514, содержащий R68.45, то реципиентные ризобии индуцировали образование клубеньков на инокулированных растениях при разведении продуктов скрещивания до 10⁻⁵ (для контроля селекции использовали стрептомицин плюс канамицин). В опытах такого рода детерминанта *Nod*⁺ мобилизовалась с частотой 4 × 10⁻³ на *Km*^R-реципиент.

Анализ реципиентных ризобий, изолированных из клубеньков клевера показал, что большая их часть не содержит плазмид pRtr514a и R68.45, но содержит вместо них новую плазмиду с молекулярной массой ~220 МДа (рис. 21.1, А, дорожка 3). Вместе с тем изо-

ты из клубеньков были $Km^R Tc^R Cb^R$; это свидетельствует о том, что в них содержатся маркеры плазмиды R68.45, а один из тестированных изолятов передавал признак Km^R с частотой 10^{-3} — 10^{-4} Nod⁻-штамму PN118. Все 10 тестированных Km^R -трансконъюгантов были Nod⁻ и получили лишь плазмиду с молекулярной массой 220 МДа. На основании изложенных данных можно было заключить, что плазида с молекулярной массой 220 МДа, названная рPN1, представляет собой коинтегра́т, включающий рRtr514a (180 МДа) и R68.45 (39 МДа). Штамм, содержащий рPN1, который получил обозначение PN150, был использован для дальнейшей работы. После продолжительного субкультивирования и хранения штамма PN150 иногда обнаруживали изоляты, у которых отсутствовала рPN1, однако они содержали плазмиды, идентичные по электрофоретической подвижности рRtr514a и R68.45, что служит еще одним аргументом в пользу заключения о коинтегративной природе рPN1. Кроме того, после длительного хранения производных NZP514, содержащих R68.45, были выявлены штаммы, содержащие вместо рRtr514a плазмиду, идентичную по электрофоретической подвижности рPN1. Следовательно, коинтегративные молекулы возникают спонтанно во время хранения, причем с высокой частотой. Такие штаммы тем не менее сохраняют плазмиду R68.45 (рис. 21.1, В).

Перенос рPN1 в клетки *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*

Чтобы установить, сохраняет ли рPN1 присущий R68.45 признак широкого круга хозяев, были предприняты попытки ее переноса в штамм *E. coli* и *P. aeruginosa*. Штамм PN150 передавал Km^R штамму *E. coli* HB101 с частотой 10^{-3} , и трансконъюганты Km^R HB101, проанализированные на наличие плазмид, содержали рPN1 (рис. 21.1, А, дорожка 4). Один из таких трансконъюгантов, штамм PN200, был отобран для дальнейшей работы. Плазида рPN1 стабильно поддерживалась в клетках PN200 даже после нескольких субкультивирований при 37 °С в отсутствие селективных антибиотиков. Однако стабильность рPN1 зависела от мутации *recA* у штамма HB101, поскольку PN200 передавал рPN1 другим *recA*-штаммам *E. coli*, а *rec*⁻-штаммам — лишь плазмиду, электрофоретически идентичную R68.45.

В скрещиваниях с *rec*⁻-штаммом *P. aeruginosa* PA02003 штамм PN150 передавал маркер Cb^R с частотой около 10^{-4} . Только 2 из 20 Cb^R -трансконъюгантов, проанализированных на наличие плазмид, содержали рPN1, а остальные 18 несли плазмиды, не отличающиеся по электрофоретической подвижности от R68.45. Однако оба штамма PA02003/рPN1 (PN203 и PN204) стабильно поддерживали рPN1 в ходе нескольких субкультивирований. При скрещивании PN150 с *rec*⁻-штаммом *P. aeruginosa* PA01162 потомки, содержащие рPN1, не появлялись.

Штамм *E. coli* PN200 и штаммы *P. aeruginosa* PN203 и PN204 не индуцировали клубеньки на красном клевере, а штамм PN200

не проявлял активности при испытании на скручивание корневых волосков у белого клевера. Штамм PA02003 вызывал сильные искривления корневых волосков у белого клевера и индуцировал рост каллусоподобных образований в точках инициации боковых корней. Штаммы PN203 и PN204 вызывали сходные эффекты, т.е. эффектов, специфичных для плазмиды рPN1, не наблюдалось.

Перенос рPN1 в другие виды ризобий

Штамму *E. coli* PN200 было отдано предпочтение перед штаммом *R. trifolii* PN150 в качестве донора плазмиды рPN1 в скручиваниях с некоторыми штаммами *Rhizobium*, поскольку для него легко проводить контрselection на основе ауксотрофии. Кроме того, такой выбор позволяет легко отличить те клетки донора, которым удалось преодолеть контрselection, от ризобияльных реципиентов по скорости роста, росту на питательном агаре Оксфорд и морфологии колоний, а также неспособности индуцировать клубеньки на клевере.

Штамм *E. coli* PN200 передавал рPN1 различным штаммам *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. loti* и *R. meliloti* с высокой частотой (около 10^{-3}). Плазмида рPN1 влияла на симбиотическую реакцию реципиентных штаммов как на клевере, так и на их исходном бобовом растении-хозяине (табл. 21.2). Такие реакции на клевере согласуются с предложенной классификацией, по которой *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. trifolii* следует считать принадлежащими к одному виду, а *R. loti* и *R. meliloti* — к разным видам ([6, 13], Джордан, личное сообщение). Однако нельзя исклю-

21.2. Влияние плазмиды рPN1 на симбиотическое поведение ризобияльных штаммов на исходном бобовом растении-хозяине и на клевере

Реципиентный штамм	Обычный хозяин	Симбиотическая реакция обычного хозяина	рPN1-Содержащий штамм на клевере
3841	<i>Pisum sativum</i>	Nod ⁻	Nod+Fix+
NZP5471	<i>Pisum sativum</i>	Nod ⁻	Nod+Fix+
NZP5097	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nod+Fix ⁻ (крупные клубеньки, содержащие бактероиды)	Nod+Fix ⁻ (крупные клубеньки, содержащие бактероиды)
NZP2037	<i>Lotus pedunculatus</i>	Nod+Fix ⁻ (мелкие клубеньки)	Nod+Fix ⁻ (редкие, но появляющиеся клубеньки, в которых не видны ризобий)
NZP2213	<i>Lotus tenuis</i>	Nod+Fix ⁻ (редкие мелкие клубеньки)	Как у NZP2037
NZP4015	<i>Medicago sativa</i>	Nod ⁻	Nod ⁻ (вызывают скручивание корневых волосков у белого клевера)

чить возможность того, что гены симбиоза у *R. loti* и *R. meliloti* влияют на выражение генов образования клубеньков, расположенных на pPN1.

Изменение симбиотических реакций у транскопьюгантов *R. leguminosarum* и *R. phaseoli* на горохе и бобах соответственно было обусловлено утратой транскопьюгантами нативной плазмиды. Транскопьюганты штамма *R. leguminosarum* 3841 (рис. 21.2, А, дорожка 2), которые содержат плазмиду, идентичную по электрофоретической подвижности pRtr514a (рис. 21.2 В), в дополнение к pPN1, утратили плазмидную полосу, соответствующую pRL10J1-плазмиде, которая, как было установлено ранее, существенна для индукции этим штаммом клубеньков у гороха [4, 10, 11]. На утрату плазмиды транскопьюгантами NZP5471 указывает тот факт, что интенсивность второй из наиболее медленно мигрирующих плазмидных полос у транскопьюгантов была значительно ниже, чем у дикого типа (рис. 21.2, А, дорожки 6 и 8). Одновременная

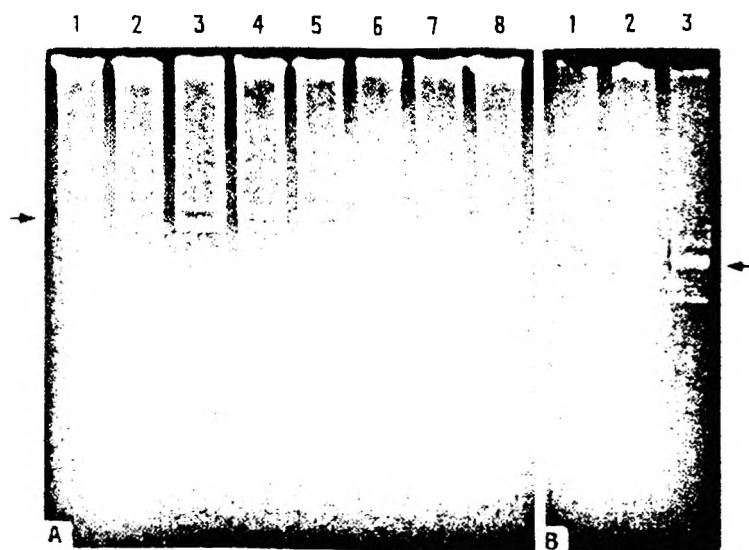


Рис. 21.2. А. Электрофорез в агарозном геле плазмид из родительских штаммов *R. leguminosarum*, pPN1-содержащих транскопьюгантов и изолятов из клубеньков растений гороха, инокулированных pPN1-содержащими транскопьюгантами. Положение pPN1 отмечено стрелкой:

дорожка 1 — штамм *R. leguminosarum* JB3841; дорожка 2 — транскопьюгант скрещивания PN200×JB3841; дорожки 3, 4, 5 — изоляты из клубеньков растений гороха, инокулированных транскопьюгантами скрещивания PN200×JB3841; дорожка 6 — транскопьюгант скрещивания PN200×NZP5471; дорожка 7 — изолят из клубенька растения гороха, инокулированного транскопьюгантом скрещивания PN200×NZP5471; дорожка 8 — штамм *R. leguminosarum* NZP5471.

В. Электрофорез плазмид в агарозном геле. Положение плазмиды pRtr514a отмечено стрелкой:

дорожка 1 — штамм *R. trifolii* PN150; дорожка 2 — штамм *R. trifolii* PN100; дорожка 3 — транскопьюгант скрещивания PN200×JB3841.

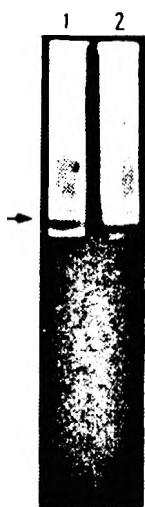


Рис. 21.3



Рис. 21.4

Рис. 21.3. Электрофоретический анализ плазмид в агарозном геле. Положение rPN1 отмечено стрелкой:

дорожка 1 — штамм *R. phaseoli* NZP5097; дорожка 2 — трансконъюгант скрещивания PN100 x NZP5097.

Рис. 21.4. Электрофоретический анализ плазмид из родительских штаммов *R. trifolii* и трансконъюгантов в агарозном геле. Положение rPN1 отмечено стрелкой:

дорожка 1 — штамм *R. trifolii* PN150; дорожка 2 — трансконъюгант скрещивания PN200 x PN150; дорожка 3 — штамм *R. trifolii* NZP596; дорожка 4 — трансконъюгант скрещивания PN200 x NZP596.

утрата способности индуцировать клубеньки на горохе означает, что данная плазмида контролирует симбиоз. Трансконъюганты штамма NZP5097 явно утратили нативную плазмиду, подвижность которой несколько меньше, чем у rPN1 (рис. 21.3). Их способность индуцировать неэффективные клубеньки на фасоли может быть обусловлена плазмидой rPN1, поскольку штамм *R. trifolii* PN150 также индуцирует клубеньки на фасоли, хотя и слабее rPN1 вытеснила также плазмиду у двух из четырех Nod⁺-штаммов *R. trifolii*, в которые она была перенесена. Трансконъюганты штамма PN100 (рис. 21.3, дорожки 1 и 2) утратили симбиотическую плазмиду pRtr514a [18], а трансконъюганты штамма NZP596 (рис. 21.4, дорожки 3 и 4) — плазмиду, которая гибридизовалась с *EcoRI*-фрагментом генов *K. pneumoniae nifKDHU* из pSA30, следовательно, она также представляет собой симбиотическую плазмиду. Итак, rPN1 несовместима с симбиотическими плазмидами, что способствовало их идентификации у нескольких штаммов *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. trifolii*.

Чтобы выяснить, можно ли изолировать трансконъюганты *R. leguminosarum*, которые сохранили способность к индукции клубеньков на горохе, для инокуляции растений гороха, использовали трансконъюганты, подвергнутые лишь одному циклу очистки из отдельных колоний. Три из четырех трансконъюгантов штамма 3841 и один из четырех трансконъюгантов NZP5471 индуцировали формирование клубеньков. Ризобияльные клетки были изолированы из двух клубеньков, индуцированных каждым из указанных Nod⁺-трансконъюгантов, подвергнутых однократной очистке, и четыре изолята из отдельных колоний из каждого клубенька были

проанализированы на содержание плазмид и на способность индуцировать клубеньки на горохе и клевере.

Выделенные из клубеньков бактерии штамма 3841 утратили рPN1, но содержали плазмиды тех же размеров, что и R68.45 и рRtr514a, и обладали способностью индуцировать клубеньки на клевере. К тому же несколько изолятов из клубеньков, индуцированных двумя из однократно очищенных трансконъюгантов, содержали плазмиду с такой же электрофоретической подвижностью, что и рRL10JI (рис. 21.2, А, дорожка 4), и индуцировали клубеньки на горохе. Однако другие изоляты из тех же клубеньков не содержали рRL10JI (рис. 21.2, А, дорожка 3) и не обладали способностью индуцировать клубеньки на горохе. Изоляты из клубеньков, индуцированных третьим однократно очищенным трансконъюгантом, также не содержали рRL10JI, но тем не менее индуцировали клубеньки у гороха. Анализ плазмидных профилей этих изолятов в нескольких гелях (рис. 21.2, А, дорожка 5, а также непредставленные данные) показал, что вторая по величине плазида изолятов характеризуется несколько меньшей подвижностью, чем аналогичная плазида штамма 3841, следовательно, она значительно превосходит последнюю по размеру. Данные изоляты и изоляты из клубеньков гороха, которые содержали как рRL10JI, так и рRtr514a, сохранили способность стабильно индуцировать клубеньки у гороха и клевера после нескольких субкультивирований. Клубеньковые изоляты штамма NZP5471 (рис. 21.2, А, дорожка 7) утратили рPN1 и рRtr514a, но содержали R68.45. Вместе с тем интенсивность полос их нативных плазмид была такой же, как у клеток дикого типа, следовательно, они содержали нативную плазмиду, отсутствующую у очищенных трансконъюгантов, кроме того, они индуцировали клубеньки на горохе, но не индуцировали на клевере. Изложенные результаты показывают, что у однократно очищенных трансконъюгантов не произошло полной потери нативной симбиотической плазмиды и что растения гороха способны отбирать редкие ризобийные клетки, удержавшие симбиотическую плазмиду вместо рPN1. Тот факт, что рRtr514a и (или) R68.45 не проявляют несовместимость по отношению к рRL10JI, согласуется с прежними наблюдениями, свидетельствующими, что симбиотические плазмиды у *R. trifolii*, *R. leguminosarum* и *R. phaseoli* могут стабильно сосуществовать [2, 3, 12], несмотря на значительную гомологию последовательностей их ДНК [14]. Пока не ясно, почему несовместимость проявляет рPN1, а не рRtr514a, но, возможно, это связано с тем, что рPN1 существует в большем числе копий, чем рRtr514a, за счет ее R68.45-репликона.

Эффект рPN1 на симбиотические свойства трансконъюгантов *R. loti* и *R. meliloti* на растениях лотоса и люцерны соответственно (табл. 21.2) не обусловлен утратой генетической информации, поскольку из рPN1-содержащих трансконъюгантов не составляло труда выделить штаммы, утратившие рPN1 и сохранившие способность к симбиозу. Трансконъюганты штаммов *R. loti*, NZP2037 и NZP2213, содержащие рPN1 (рис. 21.5, дорожки 4 и 7), были

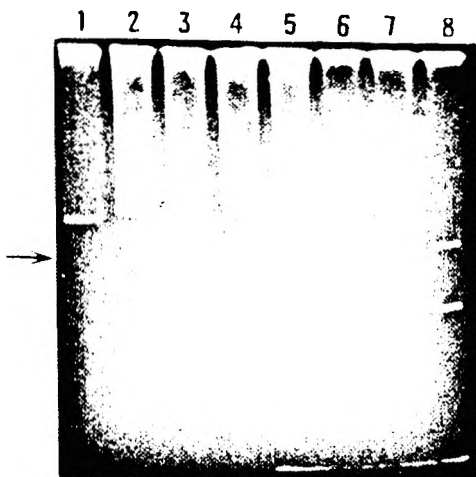


Рис. 21.5

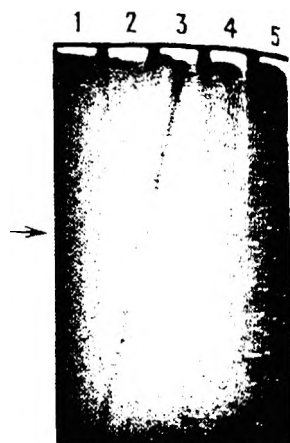


Рис. 21.6

Рис. 21.5. Электрофоретический анализ плазмид штамма *E. coli* PN200, родительских штаммов и трансконъюгантов *R. loti* в агарозном геле. Положение рPN1 отмечено стрелкой:

дорожка 1 — штамм *E. coli* PN200; дорожка 2 — штамм *R. loti* NZP2037; дорожка 3 — быстрорастущий трансконъюгант скрещивания PN200 x NZP2037; дорожка 4 — медленно растущий трансконъюгант скрещивания PN200 x NZP2037; дорожка 5 — быстрорастущий «ревертант» трансконъюганта NZP2037 рPN1; дорожка 6 — штамм *R. loti* NZP2213; дорожка 7 — медленно растущий трансконъюгант скрещивания PN200 x NZP2213; дорожка 8 — быстрорастущий трансконъюгант скрещивания PN200 x NZP2213.

Рис. 21.6. Электрофоретический анализ в агарозном геле плазмид штамма *E. coli* PN200 (дорожка 1), штамма *R. meliloti* NZP4015 (дорожка 2), трансконъюганта скрещивания PN200 x NZP4015 (дорожки 3) и производных этого трансконъюганта (дорожки 4 и 5). Положение рPN1 отмечено стрелкой.

очень медленно растущими (их колонии достигали размера 1 мм на S10-чашках, содержащих тетрациклин, лишь через 8 дней после посева), но давали быстрорастущих «ревертантов». Такие ревертанты утратили рPN1, но сохранили R68.45, а некоторые и плазмиду, по размеру равную рRtr514a (рис. 21.5, дорожки 3, 5 и 8), и эффективно индуцировали клубеньки на лотосе. Транskonъюганты штамма *R. meliloti* NZP4015, содержащие рPN1 (рис. 21.6, дорожка 3), были не способны индуцировать клубеньки на люцерне в течение двух недель после инокуляции, однако при последующей инкубации появлялись эффективные клубеньки. Ризобияльные клетки, изолированные из таких клубеньков, потеряли рPN1, но содержали R68.45 (рис. 21.5, дорожка 5). Кроме того, после продолжительного субкультивирования рPN1-содержащих трансконъюгантов были выделены эффективные штаммы *R. meliloti*, содержащие R68.45 совместно с плазмидой, обладающей такой же подвижностью, как рRtr514a (рис. 21.5, дорожка 4), или без нее. Следовательно, эффект рPN1, вероятно, обусловлен влиянием на выражение генов симбиоза или на функцию их продуктов. Сход-

ный эффект наблюдался и с плазмидой *R. leguminosarum* в клетках *R. phaseoli* [2]; он был назван физиологической несовместимостью [1].

Транспозонный мутагенез плазмиды рPN1

рPN1 была перенесена в штамм PN205, производный штамма *E. coli* HB101, содержащий в своей хромосоме транспозон Tn7. При использовании полученного штамма PN206 в качестве донора в скрещиваниях с Nod⁻-штаммом *R. trifolii* PN165 трансконъюганты *R. trifolii*, устойчивые к стрептомицину (селективному для Tn7) и тетрациклину (селективному для рPN1), появлялись с частотой порядка 10⁻⁶, тогда как перенос одной плазмиды рPN1 происходил с частотой 10⁻³. Трансконъюганты были также устойчивы к спектиномицину (другой признак, определяемый транспозоном Tn7), следовательно, они не были спонтанными, устойчивыми к стрептомицину мутантами. Из примерно 500 Str^RTc^R-трансконъюгантов штамма PN165, испытанных на растениях, четыре были Nod⁻. Три Nod⁻-штамма получили плазмиду, несколько превышающую по размеру R68.45; по-видимому, это плазида R68.45::Tn7. Четвертый штамм получил плазмиду с молекулярной массой 120 МДа, которая предположительно является делеционной производной рPN1. Восемь трансконъюгантов индуцировали неэффективные клубеньки и получили плазмиду с такой же электрофоретической подвижностью, как у рPN1, или, в одном случае, несколько большей. Эти результаты означают, что штамм PN165 утратил *fix*- и *nod*-гены и что в рPN1 закодированы как *fix*-, так и *nod*-гены. В настоящее время ведется физическое картирование Tn7-вставок в рPN1 с использованием плазмид, изолированных из штаммов *E. coli*.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Симбиотическая плазида *R. trifolii* рRtr514a была мобилизована с помощью плазмиды R68.45, обладающей широким кругом хозяев, в форме коинтегративной плазмиды рPN1, которая была стабильна в *rec*⁻-штаммах *E. coli* и *P. aeruginosa* и в большинстве быстрорастущих ризобияльных штаммов. Это свидетельствует о том, что большинство ризобияльных штаммов могут быть неэффективны в отношении генетической рекомбинации.

рPN1 влияла на симбиотические свойства ризобияльных штаммов, в которые она была внесена, как в отношении клевера, так и их исходных бобовых растений-хозяев (табл. 21.2). Она, по-видимому, вытесняла нативные симбиотические плазмиды из штаммов *R. leguminosarum* и *R. phaseoli*, а также из некоторых Nod⁺-штаммов *R. trifolii*. Однако ее влияние на симбиотические свойства штаммов *R. loti* и *R. meliloti* на лотосе и люцерне соответственно было обусловлено воздействием на выражение нативных генов симбиоза, а не утратой генетической информации, поскольку способные к симбиозу штаммы, утратившие рPN1, легко выделялись из рPN1-содержащих трансконъюгантов.

Транспозонный мутагенез рPN1, осуществленный с помощью донорного штамма *E. coli*:Tn7/pPN1 в скрещиваниях с No-штаммом *R. trifolii*, показал, что гены, закодированные в плазиде, необходимы для протекания нескольких стадий, ведущих к формированию корневых клубеньков на клевере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beringer JE, Brewin NJ, Johnston AWB (1980) The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity* 45:161—165
2. Beynon JL, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmids and host-range specificity of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J Gen Microbiol* 120:423—429
3. Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120:413—420
4. Buchanan-Wollaston AV, Beringer JE, Brewin NJ, Hirsch PR, Johnston AWB (1980) Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. *J Gen Genet* 178:185—190
5. Chandler PM, Krishnapillai V (1974) Isolation and properties of recombination-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mut Res* 23:15—23
6. Crow VL, Jarvis BDW, Greenwood RM (1981) Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. *Int J Syst Bacteriol* 31:152—172
7. Dénarié J, Boistard P, Casse-Delbart F, Atherly AG, Berry JO, Russek J (1981) Indigenous plasmids of *Rhizobium*. In: Giles KL, Atherly AG (eds) *Rev Cytol Suppl* 13. Academic Press, London New York, pp 225—246
8. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1:584—588
9. Haas D, Holloway BW (1976) R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 144:243—251
10. Hirsch PR, Montagu M Van, Johnston AWB, Brewin NJ, Schell J (1979) Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120:403—412
11. Hombrecher G, Brewin NJ, Johnston AWB (1981) Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in *Rhizobium leguminosarum* and *R. phaseoli*. *Mol Gen Genet* 182:133—136
12. Hooykaas PJJ, Brussel AAN Van, Dulk-Ras H Den, Slogteren GMS, Schilperoord RA (1981) Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 291:351—353
13. Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ (1982) *Rhizobium loti*: a new species of legume root nodule bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 32:378—380
14. Prakash RK, Schilperoord RA, Nuti MP (1981) Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes. *J Bacteriol* 145:1129—1136
15. Ronson CW, Lyttleton P, Robertson JG (1981) C4-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* from ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4284—4288
16. Ronson CW, Riddiford AHH, Scott DB (1983) Transfer of *Rhizobium trifolii* symbiotic plasmid::R68.45 cointegrate to strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and fastgrowing *Rhizobium* species. (submitted)
17. Rosenberg C, Casse-Delbart F, Dusha I, David M, Boucher C (1982) gaplasmids in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 150:402—406
18. Scott DB, Ronson CW (1982) Identification and mobilization by cointegration of a nodulation plasmid in *Rhizobium trifolii*. *J Bacteriol* 150:43—43
19. Vincent JM (1970) International biological programme handbook. No. 1. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell, Oxford

22. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОБЛАСТЕЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГЕНОВ СИМБИОЗА У RHIZOBIUM TRIFOLII И RHIZOBIUM PARASPONIA

Б. РОЛЬФ, М. ДЖОРДЖЕВИЧ, Н. МОРРИСОН,
ДЖ. ПЛАЗИНСКИ, Г. БЕНДЕР, Р. РИДЖ, У. ЗУРКОВСКИ, ДЖ. ТЕЛЛАМ
и ГРЕССХОФ и ДЖ. ШАЙН*

РИЗОБИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ, СПОСОБНЫЕ ИНФИЦИРОВАТЬ БОБОВЫЕ И НЕБОБОВОЕ РАСТЕНИЕ PARASPONIA

Rhizobium, способные фиксировать азот в симбиозе с бобовыми растениями, были разделены на две основные группы по признаку скорости роста на лабораторных средах — так называемые быстрорастущие и медленно растущие штаммы [9]. Однако недавно было показано, что ряд медленно растущих штаммов *Rhizobium*, выделенных из растений группы коровьего гороха, может индуцировать клубеньки у небобового растения *Parasponia* (представитель семейства Ulmaceae). В свою очередь, ряд изолятов из клубеньков *Parasponia* оказались типичными медленно растущими организмами, круг хозяев которых варьирует внутри представителей группы коровьего гороха [8].

Из свыше двухсот изолятов, собранных в Новой Гвинее на растениях группы коровьего гороха (к которой относятся виды, у которых клубеньки обычно индуцируются медленно растущими *Rhizobium*), Триник [7] обнаружил только один быстрорастущий бактериальный штамм. Этот штамм, NGR234, похож на быстрорастущих *Rhizobium* тропического дерева *Leucaena leucocephala* и способен индуцировать клубеньки у многих растений группы коровьего гороха, а также у люцерны (*Medicago sativa*), *Leucaena* и *Acacia farnesiana* [7]. Кроме того, эта быстрорастущая ризобия может индуцировать клубеньки на небобовом растении *Parasponia* [8]. В отличие от медленно растущих ризобий *Parasponia* симбиоз между *Parasponia* и штаммом NGR234 неэффективен по связыванию азота. Ясно, что генотип этого организма позволяет ему индуцировать клубеньки у широкого круга растений и пересекать

* B. G. Rolfe, M. A. Djordjevic, N. A. Morrison, J. Plazinski, G. L. Bender, P. Ridge, W. Zurkowski, J. T. Tellam, P. M. Gresshoff, and J. Shine, Genetics Department, Research School of Biological Sciences, Australian National University, Canberra City, A. C. T. 2601, Australia.

границы, разделяющие не только быстро- и медленно растущие ризобии, но и такие растения, как бобовые и *Parasponia*.

Было установлено, что симбиотические свойства многих быстро растущих ризобий из регионов с умеренным климатом могут утрачиваться в процессе продолжительного воздействия повышенных температур. Утрату способности к симбиозу объясняют потерей крупных эндогенных плазмид или делециями в таких плазидах [10, 11]. Культуру штамма ANU240 (спонтанный, устойчивый к стрептомицину мутант штамма NGR234) в логарифмической фазе роста переносили на твердую среду YM и инкубировали при 37°C семь дней, в течение которых роста не было. Затем YM-чашки инкубировали при комнатной температуре; пять дней спустя появилось около 100 отдельных колоний на чашку. Единичные колонии из таких культур, испытавших воздействие температуры 37°C, были очищены, после чего определяли их устойчивость к антибиотикам и ростовые характеристики, чтобы убедиться, что это не загрязнения. Очищенные клоны испытывали на способность индуцировать клубеньки на тропическом бобовом растении сиратро (*Macroptilium atropurpureum*) чашечным методом [1, 6]. Около 25% тестированных клонов не индуцировали клубеньки. Фенотипы, индуцирующие (Nod⁺) и не индуцирующие (Nod⁻) клубеньки, оказались стабильными, не reverтирующими при субкультивировании. Плазмидные профили этих штаммов исследовали с помощью модифицированной методики в геле [2], во всех случаях Nod⁺-штаммы содержали плазмиду массой около 300 МДа (она обозначена pNM3AN) (рис. 22.1, А). У всех Nod⁻-штаммов не была обнаружена ни плазида 300 МДа, ни ее делеционная форма.

Один из излеченных тепловым воздействием Nod⁻-штаммов ANU264, был испытан на способность индуцировать клубеньки у ряда растений, которые обычно образуют их в симбиозе с клетками NGR234. Оказалось, что штамм ANU264 не индуцирует клубеньки у следующих растений: *Vigna unguiculata*, *Lablab purpureus*, *Macroptilium lathyroides*, *Leucaena leucocephala* и *Parasponia andersonii*, в отличие от штамма ANU240, который вызывает образование клубеньков у всех перечисленных выше бобовых и небобовых растений.

Для исследования корней растений сиратро, инокулированных клетками штамма ANU240 или ANU264, воспользовались микроскопическим методом Фареуса [3]. В то время как штамм ANU240 вызывал скручивание и сильное искривление корневых волосков, а также образование инфекционных нитей, мутантный штамм не оказывал видимого влияния на морфологию корневых волосков.

Блоттинг-гибридизация по Саузерну показала, что радиоактивно меченная ДНК из клонированного фрагмента генов *nifH* *R. trifolii* гибридуется с ДНК штамма ANU240, в отличие от ANU264. Область генов *nifHD* штамма ANU240, по-видимому, локализована в двух *EcoRI*-фрагментах размером около 3 и 4 т. п. (рис. 22.1, В). В качестве контролей были взяты ДНК плазмидных штаммов ANU264 (pBR1AN) и ANU265 (pJB5J1), поскольку ра-

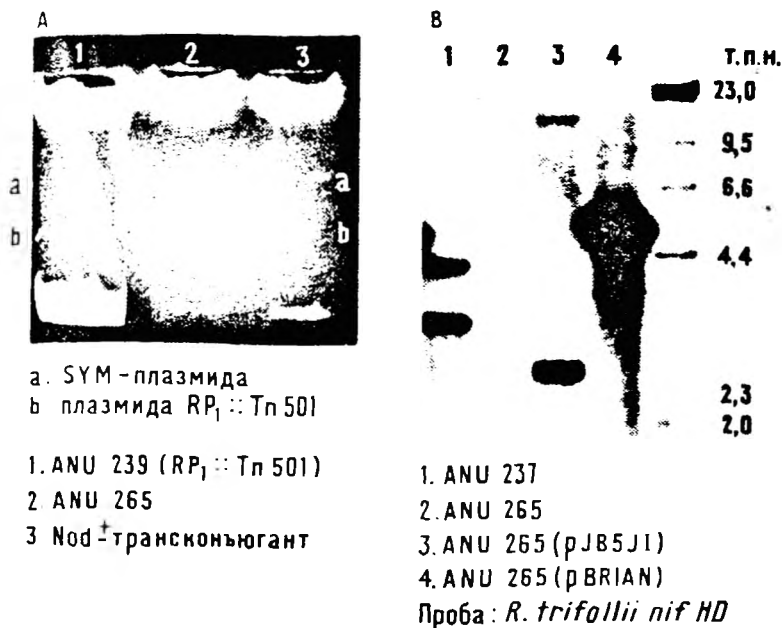


Рис. 22.1. А. В.

было показано, что эти плазмиды кодируют гены нитрогеназы [4, 6].

Способность излеченных тепловым воздействием штаммов эффективно индуцировать клубеньки на корнях сиратро была восстановлена путем возвратного внесения плазмиды pNM3AN. Это было достигнуто с помощью мобилизации Sym-плазмиды плазмидой P1-группы RP1::Tn501 [5] из штамма ANU239 (устойчивый к рифампицину вариант NGR234) в ANU265 (устойчивый к спектиномицину производный штамма ANU264). Анализ плазмид в гелях показал, что индуцирующие клубеньки трансконъюганты содержат Sym-плазмиду pNM3AN и RP1::Tn501 (рис. 22.1, А). Данных, свидетельствующих о стабильной коинтеграции этих двух плазмид, получено не было.

Изложенные результаты показывают, что плазида 300 МДа штамма ANU240 необходима для формирования инфекционных нитей и скручивания корневых волосков у сиратро, а также для образования клубеньков у ряда видов семейства бобовых и небобового растения *Parasponia*. Характер блоттинг-гибридизации клонированной ДНК *nifHD* с суммарной геномной ДНК свидетельствует, что гены нитрогеназного комплекса также находятся на плазмиде pNM3AN массой 300 МДа.

ТРАНСПОЗОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ШТАММА ANU237 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Плазмиды-самоубийцы pJB4J1 и pSP601 (которые включают Tn5 и фаг Mu) передавали устойчивость к канамицину (Km^R) штамму ANU237 с частотой порядка 10^{-3} . Обнаружено, однако, и одновременное наследование других маркеров устойчивости к антибиотикам этих плазмид. Более того, при скрещивании предполагаемых Tn5-транспозонных мутантов со штаммом *E. coli* RR1 30—50 % клонов обладали способностью переносить маркер Km^R в клетки *E. coli* с высокой частотой. Альтернативная Tn5-мутagenная система, разработанная А. Пюлером и Р. Симоном, была затем испытана на штамме ANU237 и его производных. Она включает использование плазмиды pSUP101 сконструированной путем клонирования сайта мобилизации (*mob*- или *oriT*-сайта) плазмиды RP4 в гене устойчивости к тетрациклину мульткопийного вектора pACYC184. Это позволяет мобилизовать pSUP101 в транспозонными плазмидами группы *IncP1*, так как *mob*-сайт (*oriT*) является начальной точкой системы переноса *IncP1*. Транспозон Tn5 был интегрирован в pSUP101, что дало начало плазмиде pSUP1011. Как pSUP101, так и pSUP1011 способны мобилизоваться в штаммы *E. coli* с частотой до 100 %. Поскольку начальная точка вегетативной репликации (*oriV*) плазмиды pACYC184 (*colE1*-подобный вектор) ведет происхождение из клеток *E. coli*, указанные плазмиды способны поддерживаться лишь в клетках *E. coli*. Система переноса *IncP1* функциональна в широком круге хозяев, однако плазмиды, способные мобилизоваться в бактериальные организмы, отличные от *E. coli*, поддерживаться в них не могут. Поэтому pSUP1011 представляет собой превосходный вектор-самоубийца для мутагенеза *Rhizobium*.

При использовании плазмиды-самоубийцы pSUP1011 в скрещиваниях на фильтрах с участием ANU240 маркер Km^R передавался с частотой порядка 10^{-5} . Устойчивые к канамицину колонии, изолированные в данной системе транспозонного мутагенеза, не проявляли повторной передачи Km^R . Однако около 20 % Km^R -колоний были также Sm^R (еще один маркер плазмиды pSUP1011). Клоны $Km^R Sm^R$ считались потенциально истинными Tn5-мутантами. Свыше 3000 Km^R колоний, выделенных из двух отдельных скрещиваний, были очищены и испытаны как возможные ауксотрофы и симбиотические мутанты на минимальном TM-агаре на растениях сиратро. Около 1,3 % выделенных мутантов были ауксотрофами, а также разнообразными симбиотическими мутантами (табл. 22.1). Хромосомную или плазмидную локализацию Tn5 у *Nod*⁻ мутантов определяли посредством гибридизации клонированного *EcoRI*-фрагмента (содержащего Tn5 и прилегающую к нему ризобияльную ДНК, выделенную из разных *Nod*⁻ мутантов) в гелях, содержащих ДНК из родительского штамма ANU240, а также из ANU264 (у которого отсутствует эндогенная *Sy* плаزمида pNM3AN).

Тип мутантов	Число мутантов	Примечания
Ауксотрофы		
ADE	3	Частота реверсий: $<10^{-8}$
URA	3	
ARG	2	
MET	1	
CYS	2	
TRP	4	
LEU	1	Проанализирован 21 мутант с Tn5-вставками
ASP	2	18 единичных Tn5-вставок
TYR	1	2 двойные Tn5-вставки
ADE URA	2	1 тройная Tn5-вставка
ASP GLU	4	Положение Tn5-вставок, по-видимому, случайно
MET CYS	1	
ISO VAL	3	
Потребность неизвестна	7	
Симбиотические мутанты		
Nod ⁻	5	1 мутант несет единственную Tn5-вставку на <i>Sym</i> -плазмиде, у 4 они локализованы в хромосоме
Задержка образования клубеньков	9	
Формирование дефектных клубеньков	1	
Fix ⁻	1	

СОЗДАНИЕ МОБИЛИЗУЕМОЙ *Sym*-ПЛАЗМИДЫ pNM4AN

$Sm^R Km^R$ -Клоны, встречавшиеся среди отобранных Km^R -клонов ANU240 с частотой 20 %, вероятно, были обусловлены включением pSUP1011 в какие-то участки генома. Включение в репликон должно приводить к спасению обоих маркеров Km^R и Sm^R и к встройке *mob*-сайта. Если бы такие вставки располагались в хромосоме, они обеспечивали бы сайт для мобилизации хромосомы с высокой частотой в *транс*-положении под действием *tra*-функции плазмиды из группы *IncP1*. Если бы вставка располагалась в симбиотической плазмиде pNM3AN, последняя также должна была бы мобилизоваться с высокой частотой.

Модели коинтеграции или сращивания репликонов под воздействием транспозонов предсказывают, что при слиянии pNM2AN и pSUP1011 должны возникнуть две копии Tn5. Они будут прямыми повторами, ограничивающими последовательность pSUP1011; *mob*-сайт должен находиться между транспозонами. Для поддержания коинтеграта можно применить селективное давление, ведя отбор по признаку Sm^R . Если произойдет гомологичная рекомбинация между двумя копиями Tn5, это даст pNM3AN::Tn5 и копию pSUP1011. pSUP1011 не может реплицироваться независимо в клетках *Rhizobium*, и маркер Sm^R будет

утрачен. Поэтому клетки, в которых контегра́т распался, будут чувствительны к Sm^R .

Чтобы проверить эту гипотезу, $pSUP1011$ была внесена скрещиванием в клетки ANU239 ($R68.45\Delta Km^R$). Плазмида $R68.45\Delta Km^R$ была использована для обеспечения tra^+ -функциями для последующей мобилизации маркера Km^R или Sm^R . Реципиентные транс-конъюганты отбирались на среде TY с добавкой Rif и Km , Km и Sm или одного Sm , чтобы измерить частоты передачи этих маркеров. Частота переноса Sm^R была такой же, как и $Km^R Sm^R$ (5×10^{-7}), тогда как частота переноса Km^R составила около 10^{-6} . Когда Km^R -клоны были скрещены со штаммом *E. coli* RR1 для проверки способности передавать Km^R и Sm^R , оказалось, что лишь клоны Sm^R способны переносить как Km^R , так и Sm^R . Клоны $Km^R Sm^R$ не обладали способностью передавать маркер Km^R клет-

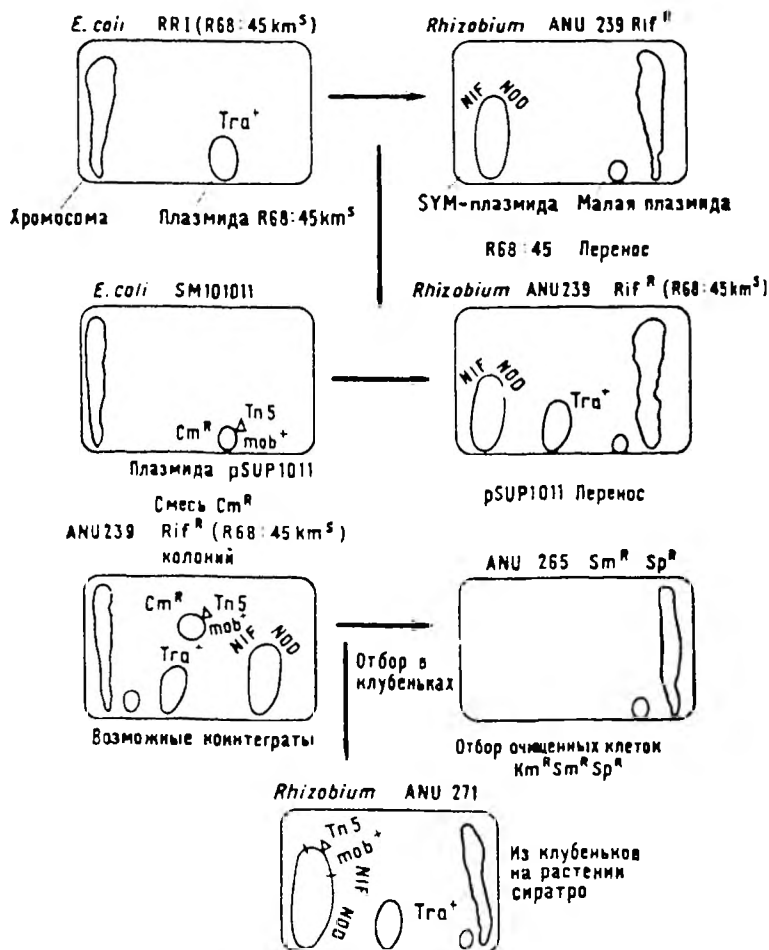


Рис. 22.2. Создание мобилизуемой Sym-плазмиды.

кам *E. coli*. Это еще один аргумент в пользу того, что в клонах $Km^R Cm^S$ произошло истинное Tn5-самоубийство, поскольку они, видимо, утратили как маркер Cm^R , так и *mob*-сайт.

Судя по признакам Tc^R и Ap^R , во всех упомянутых выше скрещиваниях с участием производных штамма ANU239 ($R68.45\Delta Km$) плазмида $R68.45\Delta Km$ также передавалась клеткам *E. coli*. Все производные штамма ANU239 ($R68.45\Delta Km$) были свободны от загрязнения клетками донора *E. coli* (рис. 22.2). Различные колонии ANU239 ($R68.45Km^S$) ($pSUP1011$) собрали вместе и затем скрестили со штаммом ANU265, ведя отбор колоний-потомков $Km^R Sm^R Sp^R$. Полученные колонии дважды отпечатали на селективных чашках, а затем использовали культуры клеток для инокуляции растений сиратро. Через 20 дней на них образовалось 14 клубеньков (рис. 22.2). Бактерии, выделенные из таких клубеньков, имели фенотип $Km^R Cm^R Tc^R Sm^R Sp^R Rif^S$ и были способны повторно индуцировать клубеньки и передавать маркеры $Km^R Cm^R$ с высокой частотой (порядка 10^{-2}). Клетки исходного донорного штамма ни в инокуляте, ни в образовавшихся клубеньках не встречались.

СПОСОБНОСТЬ К ИНДУКЦИИ КЛУБЕНЬКОВ У РАЗНЫХ ТРАНСКОНЪЮГАНТОВ

Штамм ANU271 [$ANU265 Sm^R Sp^R$ ($R68.45Km^S$) (*Sym*-плазмида- $pSUP1011$)], изолированный из клубеньков сиратро, был взят в качестве донора для передачи вновь сконструированной мобилизуемой *Sym*-плазмиды (pNM_4AN) ряду бактериальных штаммов и для проверки способности к выражению признака индукции клубеньков на широком круге хозяев у других штаммов (рис. 22.3).

Тропическое бобовое растение
Сиратро (*Macroptilium atropurpureum*)

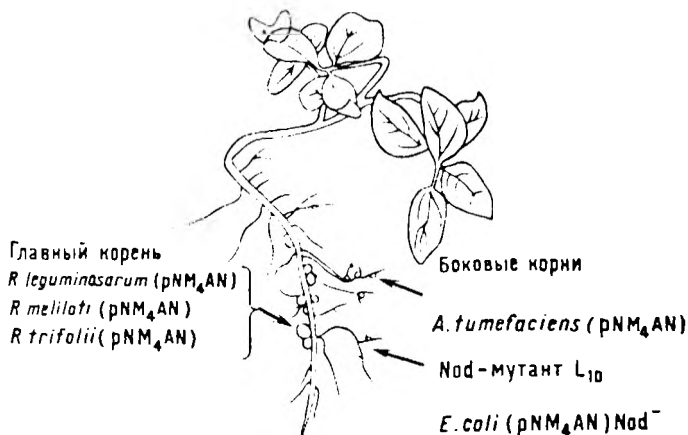


Рис. 22.3. Способность к индукции клубеньков у различных трансконъюгантов.

Быстрорастущие *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*), которые в норме инфицируют бобовые растения умеренного пояса, легко могли индуцировать клубеньки на сиратро и коровьем горохе, если они содержали *Sym*-плазмиду pNM4AN. На главном корне растений сиратро клубеньки формировались несколько медленнее, чем клубеньки, индуцируемые штаммом ANU240. Напротив, штаммы *A. tumefaciens*, несущие *Sym*-плазмиду pNM4AN, не индуцировали клубеньки на главном корне растений сиратро, но вызывали формирование слаборазвитых клубеньков на боковых корнях. Штаммы *E. coli*, содержащие данную плазмиду, не индуцировали клубеньки ни на каких тест-растениях.

СВОЙСТВА РИЗОБИАЛЬНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ ПЛАЗМИД

В *Sym*-плазмиде pBRIAN, сконструированной *in vivo*, закодированы специфичные для клевера гены образования клубеньков и нитрогеназы (рис. 22.4). Исходно она произошла от автотрансмиссивной *Sym*-плазмиды *R. leguminosarum* pJB5JI за счет рекомбинационного события *in vivo*, в которое было вовлечено не менее 60 т. п. н. ДНК. На рисунке 22.4 показана примерная протяженность области плазмиды, вовлеченной в рекомбинацию, которая привела к замещению специфичных для гороха функций образования клубеньков и фиксации азота на соответствующие функции, специфичные для клевера. В результате образовавшиеся плазмидные молекулы сохранили одинаковые размеры (130 МДа), а также ряд маркеров несимбиотических генов, первоначально закодированных в pJB5JI (табл. 22.2).

В обеих плаزمидах, pBRIAN и pJB5JI, закодированы: общая функция переноса (*Trn^t*), устойчивость к канамицину (возникшая

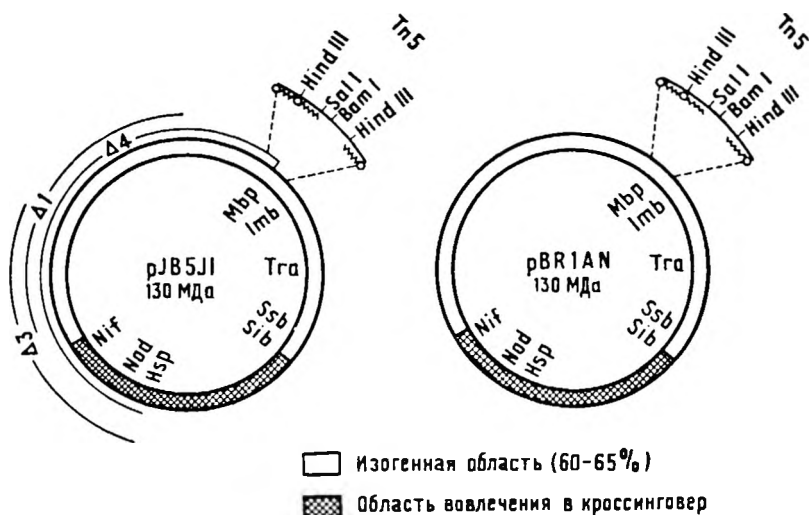


Рис. 22.4. Структура и характеристика специфичной для клевера *Sym*-плазмиды.

22.2. Сравнение известных генетических маркеров на Symb-плазмидах pBRIAN и pJB5JI

Генетические маркеры	Плазмида pJB5JI	Плазмида pBRIAN
Способность к формированию клубеньков		
прилипание к корням (<i>Roa</i> ⁺)	+	+
скручивание волосков (<i>Hac</i> ⁺)	+	+
инициация клубеньков (<i>Noi</i> ⁺)	+	+
Специфичность в отношении хозяина		
горох	+	—
белый клевер	—	+
подземный клевер	+	+
функция клубеньков (<i>Fix</i> ⁺)	+	+
автотрансмиссивность	+	+
наличие Tn5-вставок	+	+
синтез «среднего» бактериоцина (<i>Mbr</i> ⁺)	—	—
иммунитет к «средним» бактериоцинам (<i>Imb</i> ⁻)	+	+
супрессия «малых» бактериоцинов (<i>Ssb</i> ⁺)	+	+
супрессия иммунитета к «малым» бактериоцинам (<i>Sib</i> ⁺)	+	+
Гибридизация с		
<i>nod</i> -пробой <i>R. trifolii</i>	±	+
<i>nifHD</i> -пробой* <i>R. trifolii</i>	+	+

* Последовательность *nifHD* *R. trifolii* перекрестно гибридизуется с последовательностью *nifH* *R. leguminosarum*, закодированной в плазмиде pJB5JI.

в результате включения транспозона Tn5 в ген, кодирующий «средний» бактериоцин, *Mbr::Tn5*, иммунитет к убийству «средними» бактериоцинами (*Imb*⁻), супрессия образования «малого» бактериоцина (*Ssb*⁻) и супрессия иммунитета к «малым» бактериоцинам (*Sib*⁻). Выражение маркеров *Ssb*⁻ и *Sib*⁺ проявляется, когда pJB5JI или pBRIAN переносится в штамм *Rhizobium*, продуцирующий «малые» бактериоцины. Данные по гибридизации, полученные при использовании плазмиды pJB5JI и ее различных делетированных вариантов в качестве проб для гибридизации, а также результаты анализа различных несимбиотических маркеров, сохранившихся у делетированных производных pJB5JI, свидетельствуют, что обе рассматриваемые плазмиды почти на 65% изогенны. Область различий между ними включает гены, контролирующие специфичное в отношении хозяина образование клубеньков и структурные гены нитрогеназы. Эти участки разделяет расстояние примерно 25 т. п. н. Помимо симбиотических генов данная область содержит еще не менее 40 т. п. н.

ПЕРЕНОС Symb-ПЛАЗМИД В КЛЕТКИ БЫСТРО- И МЕДЛЕННОРАСТУЩИХ РИЗОБИЯ

При переносе Symb-плазмид pBRIAN и pJB5JI в различные мутантные по симбиозу штаммы *Rhizobiaceae* симбиотические функции, детерминируемые плазмидами, проявлялись по-разному.

Например, перенос этих плазмид в клетки различных делеционных по мегаплазмиде мутантов *R. meliloti* не придавал этим мутантам способность индуцировать клубеньки на горохе или клевере. Перенос pBRIAN в штамм *A. tumefaciens* придал этому штамму способность индуцировать клубеньки на клевере, тогда как pJB5J1 в указанном штамме не обеспечивала индукции клубеньков на горохе. Перенос pBRIAN в штаммы *R. leguminosarum* или *R. trifolii*, выведенные от Sum-плазмиды или с делециями в ней, придавал им способность индуцировать клубеньки на клевере, а перенос pJB5J1 в эти штаммы — на горохе.

Перенос рассматриваемых Sum-плазмид в штаммы *R. trifolii* и *R. leguminosarum*, дефектные по клеточной поверхности (Muc⁻), вызывал восстановление способности индуцировать клубеньки у неиндуцирующих их штаммов, однако образование полисахаридов клеточной поверхности не восстанавливалось, и сформировавшиеся клубеньки были неэффективны. При переносе данных Sum-плазмид в клетки Muc⁻-варианта (который не утратил способности к образованию клубеньков) усиление способности к образованию клубеньков не передавалось и Muc⁻-фенотип оставался прежним. Следовательно, для эффективного образования клубеньков необходим Muc⁺-фенотип и синтез мукополисахаридов не контролируется Sum-плазмидами. Один из Muc⁻-мутантов, ANU14, требует особого рассмотрения. Этот Nod⁻Muc⁻-мутант получен из ANU13 (вылеченного тепловым воздействием варианта штамма ANU12) путем повторного теплового воздействия. Его Muc⁻-фенотип условен и проявляется только в том случае, когда клетки культивируются на средах, источником углерода в которых служат маннит, сорбит или фруктоза. Перенос pBRIAN в клетки этого штамма не придает им способности индуцировать клубеньки на клевере, в то время как перенос pJB5J1 сообщает способность к образованию

22.3. Влияние мутации Muc⁻ на фенотипическое выражение Sum-плазмид

Штамм*	Реакция образования клубеньков			
	красный клевер	белый клевер	подземный клевер	горох
<i>R. trifolii</i>				
ANU13	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻
ANU13 (pJB5J1)	Искривление корней	Искривление корней	Nod+Fix+	Nod ⁻
ANU13 (pBRIAN)	Nod+Fix+	Nod+Fix+	Nod+Fix+	Nod ⁻
ANU14 (pJB5J1)	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod+Fix ⁻	Nod+Fix ⁻
ANU14 (pBRIAN)	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻
ANU14 Muc ⁺ -ревертант				
ANU14R (pBRIAN)	Nod+Fix+	Nod+Fix+	Nod+Fix+	Nod ⁻

* Штамм ANU13—T12Nod⁻16; ANU14—T12Nod⁻16Muc⁻2; ANU14 является Muc⁺-ревертантом родительского Muc⁻-штамма.

клубеньков на горохе (табл. 22.3). Клетки ANU14 (pBR1AN) передают при скрещиваниях устойчивость к канамицину и способность индуцировать клубеньки на клевере, что свидетельствует об интактности плазмиды. Плазида pBR1AN придавала способность к образованию клубеньков на клевере клеткам ANU13 — мутанту, из которого получен штамм ANU14. Поэтому представляется несомненным, что мутация *Misc*⁻ у штамма ANU14 каким-то образом маскировала фенотипическое выражение генов образования клубеньков на клевере, кодируемых плазмидой pBR1AN, но не влияла на фенотипическое выражение генов плазмиды pJB5J1. Точная локализация мутации *Misc*⁻ в клетках ANU14 пока не установлена.

БЫСТРОРАСТУЩИЙ ШТАММ ANU237 С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ

При внесении плазмиды pJB5J1 и pBR1AN в клетки штаммов ANU237 или ANU264 (устойчивый к стрептомицину производный ANU237, утративший эндогенную *Sym*-плазмиду pNM3AN) у трансконъюгантов изменялся круг растений, на которых они могли индуцировать клубеньки (табл. 22.4).

На белом клевере штамм ANU237 (pJB5J1) индуцировал клубеньки, сходные с клубеньками, индуцируемыми клетками ANU237 (pBR1AN). Этот факт вызывает удивление, поскольку плазида pJB5J1 определяет способность к образованию клубеньков на горохе, а штамм ANU237 не способен индуцировать клубеньки на клевере. Это указывает на то, что существует некое взаимодействие между эндогенной *Sym*-плазмидой pNM3AN и внесенной pJB5J1, что приводит к изменению круга растений, на которых сконструированный штамм может вызывать образование клубеньков. В клетках выделенного тепловым воздействием штамма ANU264 плазида pJB5J1 ведет себя, как и ожидалось (табл. 22.4).

22.4. Взаимодействия *Sym*-плазмид

Штамм	Белый клевер	Подземный клевер	Горох
ANU237	Nod ⁻ (искривление корней)	Nod ⁻	Nod ⁻ (слабая пигментация корней)
ANU237 (pBR1AN)	Nod ⁺	Nod ⁺	Nod ⁻
ANU237 (pJB5J1)	Nod ⁺	Nod ⁻	Nod ⁺
ANU264	Nod ⁻	Nod ⁻	Nod ⁻
ANU264 (pBR1AN)	Nod ⁺	Nod ⁺	Nod ⁻
ANU264 (pJB5J1)	Nod ⁻ (искривление корней)	Nod ⁻	Nod ⁺

Все клубеньки неэффективны по азотфиксации (*Fix*⁻).

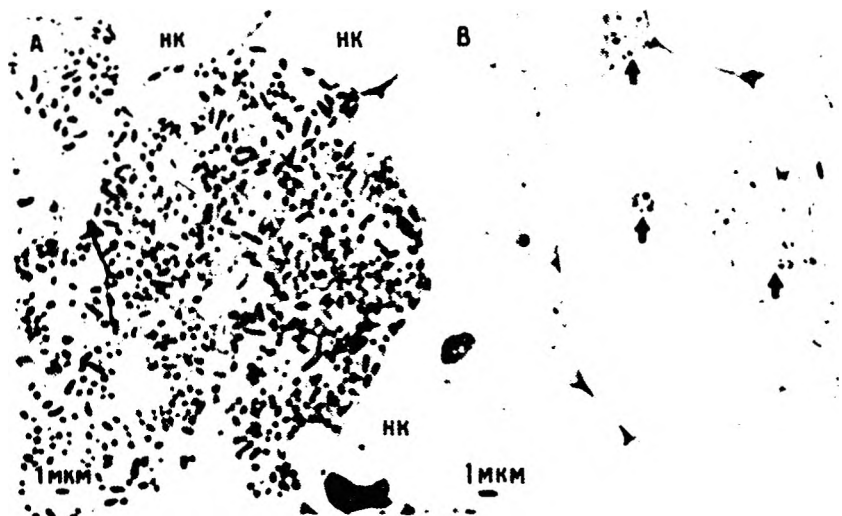


Рис. 22.5. А, В. Электронные микрофотографии единичных клеток клубенициратро (*M. atropurpureum*) после инокуляции клетками ANU289 (дикий тип) (А) или клетками ANU289 (pJB5J1) (трансконъюгант) (В). Эффект внесения плазмиды в клетки дикого типа очевиден; из инфекционных нитей (стрелки) высвобождается небольшое число бактерий, которые вскоре после этого дивертируются:

НК — неинфицированные клетки.

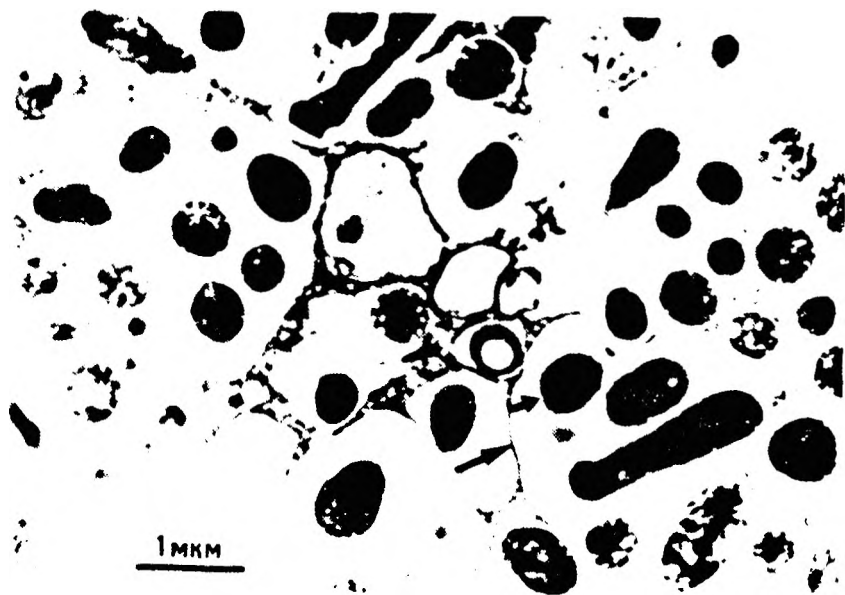


Рис. 22.6. Рисунок 22.5. А при большем увеличении. Видны «пакеты» (большая стрелка) бактеронемов (малая стрелка), насчитывающие до 15 особей на пакет.



Рис. 22.7. Рисунок 22.5. В при большем увеличении. Развитие бактерондной и перибактерондной мембраны не происходит. Бактерии подвергаются лизису (большая стрелка) вскоре после освобождения и дегенерируют (двойные стрелки). В некоторых бактериальных клетках содержатся крупные включения (малая стрелка):

ИИ — инфекционная нить; М — митохондрии.

Штамм ANU264 (pBR1AN) индуцирует клубеньки, сходные с 10-дневными клубеньками, индуцируемыми штаммом *R. trifolii* дикого типа на клевере. Клубеньки, индуцируемые штаммом ANU237 (pBR1AN), останавливаются в развитии на более ранней стадии. Штамм ANU264 (pBR1AN) к тому же способен индуцировать на клевере больше клубеньков, чем штамм ANU237 (pBR1AN), при сходных условиях инокуляции и роста. Это вновь указывает на то, что взаимодействие Symb-плазмид влияет на индукцию клубеньков и степень их развития.

Перенос плазмид в клетки медленнорастущих ризобий: влияние на индукцию клубеньков у сиратро

После переноса специфичной для гороха плазмиды pJB5J1 в медленнорастущие, специфичные для коровьего гороха штаммы *Phizobium* ANU289, CB756 и 32H1 не наблюдалось задержки начала и ранних этапов развития клубеньков. Клубеньки, однако, были неэффективными по азотфиксации. Исследование таких клу-

беньков под световым и электронным микроскопом показало, что у бактериальных штаммов, содержащих плазмиду рJB5J1, освобождение бактерий из разветвляющейся инфекционной нити было аномальным, поэтому, исходя из фенотипа, они могут быть названы $Baг^-$ (дефектное освобождение бактерий, «defective bacterial release») (рис. 22.5—22.7).

Биологическое действие сконструированных *in vitro* Sym-плазмид

Конструирование плазмиды рSO32, которая содержит фрагмент ДНК области образования клубеньков у штамма ANU843 длиной 14 т. п. н., будет описано в отдельной статье (Шайн и др. в данном сборнике). Этот участок Sym-плазмиды из *R. trifolii* достаточен для индукции клубеньков на белом клевере при внесении его

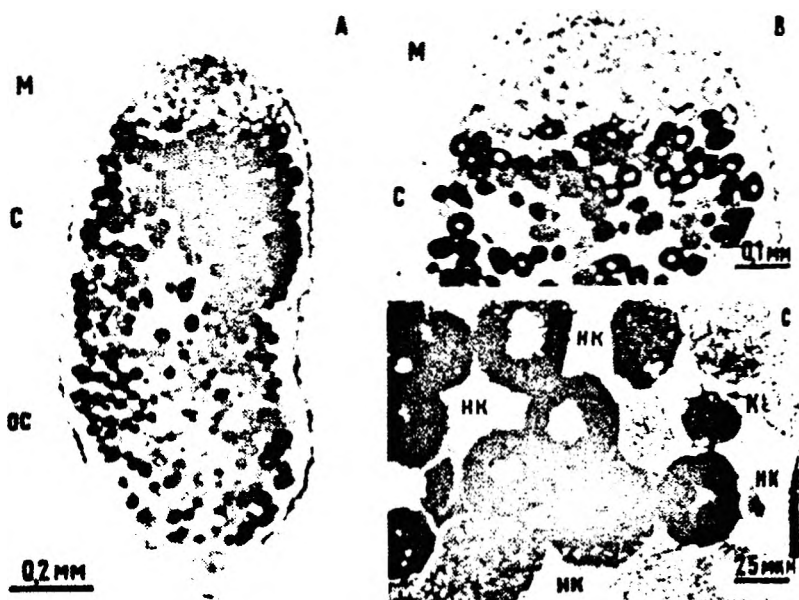


Рис. 22.8. А—С. Вид под световым микроскопом клубенька белого клевера, содержащего бактерионды штамма ANU843 (дикий тип), через 18 дней после инокуляции. А. Продольный разрез целого клубенька; обратите внимание на выступающую зону меристемы (М), большую симбиотическую область (С), которая содержит главным образом клетки, наполненные бактериоидами, и область старения (ОС), в которой большая часть клеток содержит дегенерирующие бактерионды. Имеется небольшое число неинфицированных клеток. В. Активная зона клубенька под большим увеличением. С. Наполненные бактериоидами клетки в симбиотической области; относительно высокое осмотическое давление инфицированных клеток обуславливает сжатие неинфицированных клеток (HK). Срезы по Сперру 0,5 мкм окрашены голудином голубым; К — крахмал.



Рис. 22.9. А—С. Вид под световым микроскопом клубенька белого клевера, содержащего бактерии ANU845/32 (мутантные), через 18 дней после инфекции. А. Продольный разрез целого клубенька (Кл) и поперечный разрез корня (К) (ср. с рис. 22.8. А); нет развитой меристемной зоны или симбиотической области. В и С. Клубенек при большем увеличении, видны освобожденные бактерии (но бактероиды недоразвиты) и инфекционные нити (стрелки). Срезы по Сперру окрашены толуидином голубым.



Рис. 22.10. А. Электронная микрофотография клубенька белого клевера, содержащего клетки ANU843 (дикий тип), на которой показаны бактероиды в одной клетке. Обратите внимание на дегенерирующие бактероиды (стрелки). В. Аналогичная микрофотография клубенька, содержащего клетки ANU32/845 (мутант), на которой видны освобожденные бактерии, но нет сформировавшихся бактероидов. Синтез мембран выглядит неупорядоченным (стрелки):

ИИ — инфекционная явть; К — крахмал.

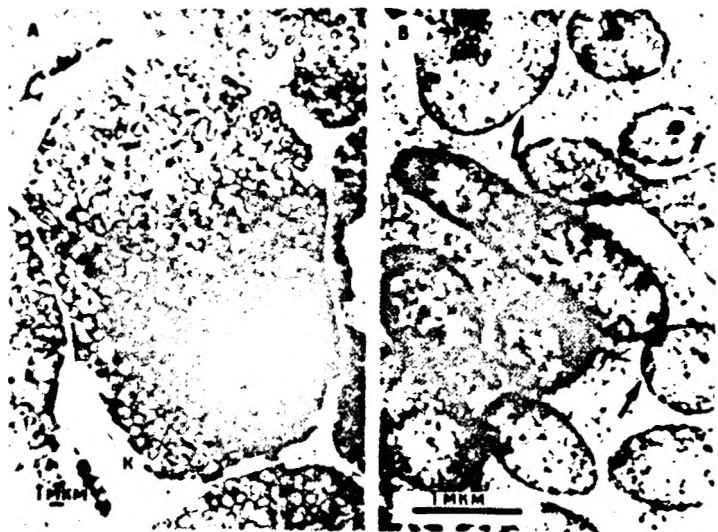


Рис. 22.11. А. Электронная микрофотография клетки клубенька подземного клевера, инфицированного штаммом ANU843 (дикий тип), через 18 дней после инфекции В. Снимок при большем увеличении, на котором показаны бактеронды с индивидуальными перибактерондными мембранами (стрелки):
К — крахмал.



Рис. 22.12. А. Электронная микрофотография клетки клубенька подземного клевера, инфицированного штаммом ANU845/32 (мутант), через 18 дней после инокуляции. Видно больше зон с освобожденными бактериями, имеющих вид слаборазвитых бактерондов. «Бактеронды» обнаруживают признаки вырождения (стрелки). В. Снимок при большем увеличении, показывающий полное формирование мембраны, «бактеронды» собраны в «пакеты» (стрелки), которые у дикого типа находятся на ранней стадии развития. «Бактеронды» в большинстве своем в два раза мельче, чем у дикого типа (ср. рис. 22.11. В):
К — крахмал.

в Nod⁻-штамм *R. trifolii*, в клетки *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* и в штамм с широким спектром хозяев ANU237.

При исследовании клубеньков белого и подземного клевера под микроскопом выявились четко выраженные различия между ними (рис. 22.8—22.12). В клубеньках белого клевера бактерии плохо освобождаются из инфекционной нити (Bag⁻-фенотип) и клубеньки развиты слабо (рис. 22.8—22.10). Напротив, в клубеньках, индуцированных на подземном клевере мутантным штаммом, несущим реконструированную плазмиду pSO32 (ANU845/32), обнаружилось большое число областей освобождения бактерий и зачатков зоны слабо развитых бактериоидов (рис. 22.11 и 22.12). Действительно, многие из освобожденных бактерий изменили морфологию и в некоторых случаях стали разбухать до размера бактериоидов дикого типа. Однако освобождение бактерий в клубеньках, индуцированных штаммом ANU845/32, происходило не в виде единичных клеток, упакованных в отдельных перибактериальных мембранах, а по 3—6 клеток на мембранную оболочку. Ясно, что Суп-плазида, сконструированная *in vitro*, может быть использована не только для определения минимального количества ДНК *Rhizobium*, необходимого для инфекции и индукции клубеньков, но и для выявления реакции различных растений-хозяев на один и тот же набор бактериальных генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cen, Y, Bender GL, Trinick MJ, Morrison NA, Scott KF, Gresshoff PM, Shine J, Rolfe BG (1982) Transposon mutagenesis in rhizobia which can nodulate both legumes and the non-legume *Parasponia*. Appl Environ Microbiol 43:233—236
2. Djordjevic MA, Zurkowski W, Rolfe BG (1982) Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. J Bacteriol 151:560—568
3. Fahraeus G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria, studied by a simple slide technique. J Gen Microbiol 16:374—381
4. Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirsch PR, Beringer JE (1978) High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. Nature 276:635—636
5. Pemberton JM, Bowen AR, Bowen AR StG (1981) High frequency chromosome transfer in *Rhodospseudomonas sphaeroides* promoted by broad host range plasmid RPI carrying mercury transposon Tn501. J Bacteriol 147:110—117
6. Rolfe BG, Gresshoff PM, Shine J (1981) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. Plant Sci Lett 19:277—284
7. Trinick MJ (1980) Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora*, and their affinities with other rhizobial groups. J Appl Bacteriol 49:39—53
8. Trinick MJ, Galbraith J (1980) The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross-inoculation group concept of legumes. New Phytol 88:17—26
9. Vincent JM (1982) Nature and basic properties of the rhizobia. In: Vincent JM (ed) Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, London New York, p 5
10. Zurkowski W (1982) Molecular mechanism for the loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. J Bacteriol 150:999—1007
11. Zurkowski W, Lorkiewicz Z (1978) Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of *Rhizobium trifolii*. Genet Res 32:311—314

23. МОЛЕКУЛЯРНАЯ АНАТОМИЯ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ ДНК У RHIZOBIUM TRIFOLII И RHIZOBIUM PARASPONIA

Д. Ж. ШАЙН, К. СКОТТ, Ф. ФЕЛЛОУЗ, М. ДЖОРДЖЕВИЧ,
П. ШОФИЛД, Д. Ж. УОТСОН и Б. РОЛЬФ *

Биологическая фиксация азота осуществляется прокариотическими организмами посредством индукции нитрогеназного ферментного комплекса, который превращает атмосферный азот в аммоний. Этот ферментный комплекс, будучи общим для всех охарактеризованных азотфиксирующих организмов, значительно отличается у разных видов по условиям его выражения. У свободноживущих бактерий рода *Rhizobium* синтез нитрогеназы в норме подавлен и индуцируется лишь в состоянии сложного симбиоза с бобовыми растениями. На первом этапе описания факторов, контролирующих выражение генов азотфиксации в процессе такого симбиоза, имеющего важное значение для сельского хозяйства, мы осуществили молекулярный анализ генов, кодирующих функции образования клубеньков (*nod*) и азотфиксации (*fix*) у двух видов *Rhizobium* (*R. trifolii* и *Rhizobium* sp. ANU289, специфического для *Parasponia*). *R. trifolii* представляет собой классический пример быстрорастущего вида *Rhizobium* с узким кругом хозяев, который не связывает азот в культуре. С другой стороны, *Rhizobium* sp. ANU289 — медленно растущий организм с очень широким кругом хозяев, который способен эффективно индуцировать формирование клубеньков у множества тропических бобовых растений, а также у небобового растения *Parasponia* [8]. У этого бактериального организма удается индуцировать фиксацию азота в культуре, хотя уровень азотфиксации у него примерно в 100 раз ниже, чем у свободноживущей бактерии *Klebsiella pneumoniae*.

Чтобы проанализировать генетический контроль образования клубеньков и фиксации азота, мы приступили к изоляции генов, ответственных за осуществление этих функций. Гены, контролирующие образование клубеньков, были идентифицированы с помощью транспозонного мутагенеза и массовой проверки растений

* J. Shine, K. F. Scott, F. F. Fellows, M. A. Djordjevic, P. Schofield, J. M. Watson, and B. G. Rolfe, Centre for Recombinant DNA Research, Department of Genetics, Research School of Biological Sciences, Australian National University, Canberra, A. C. T. 2601, Australia.

[1, 6], а *nif*-гены *Rhizobium* были выделены путем прямой гибридизации с клонированными гомологичными *nif*-последовательностями *K. pneumoniae* [3, 5]. После выделения соответствующих участков ДНК мы предприняли попытку картировать различные гены с помощью мутагенеза *in vitro* и определить их нуклеотидные последовательности. Чтобы выявить функцию каждого из этих симбиотических генов, мы ввели их в другие штаммы *Rhizobium* и близкородственные бактерии с целью проследить влияние таких генов на симбиотический и азотфиксирующий фенотип разных микроорганизмов (Рольф и др. в данном сборнике).

ГЕНЫ АЗОТФИКСАЦИИ И ОБРАЗОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВ У *R. TRIFOLIUM*

Гены *nif* и *nod* *R. trifolii* были выделены с помощью молекулярного клонирования и использованы в качестве проб для выяснения их организации в геноме этой бактерии. Проведенный анализ показывает, что оба набора генов располагаются на одной и той же крупной, так называемой симбиотической (Sym), плазмиде (рис. 23.1). Более того, установлено, что гены *nif* и *nod* очень тесно сцеплены на этой большой плазмиде, так как одна индуцированная тепловым воздействием делеция Sym-плазмиды (штамм ANU871), приводящая к выпадению около 40 т. п. н. плазмидной ДНК, элиминирует генные последовательности как *nod*, так и *nif*.

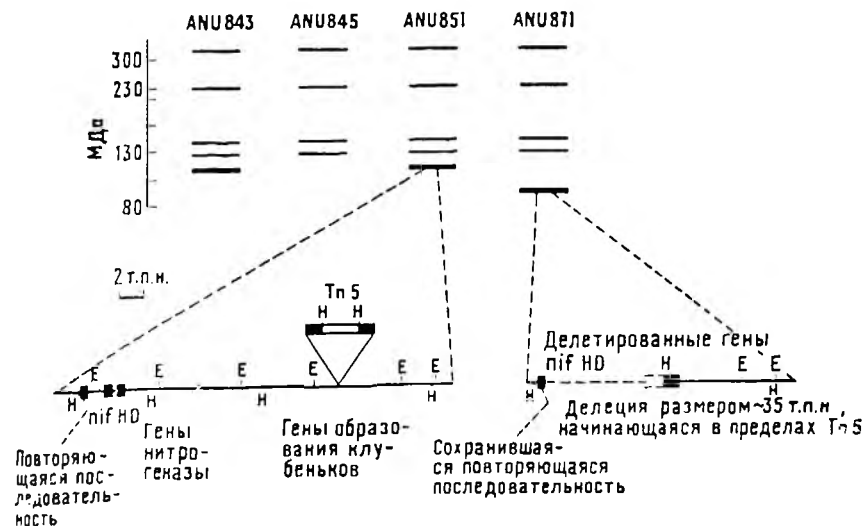


Рис. 23.1. Плазмидные профили и частичные рестрикционные карты симбиотических участков ДНК из штаммов *R. trifolii*: ANU843 — родительский штамм; ANU845 — вариант штамма ANU843, выделенный от Sym-плазмиды; ANU851 — Tn5 индуцированный, дефектный по симбиозу мутант штамма ANU843; ANU871 — индуцированный тепловым воздействием делеционный мутант штамма ANU843, дефектный по образованию клубеньков.

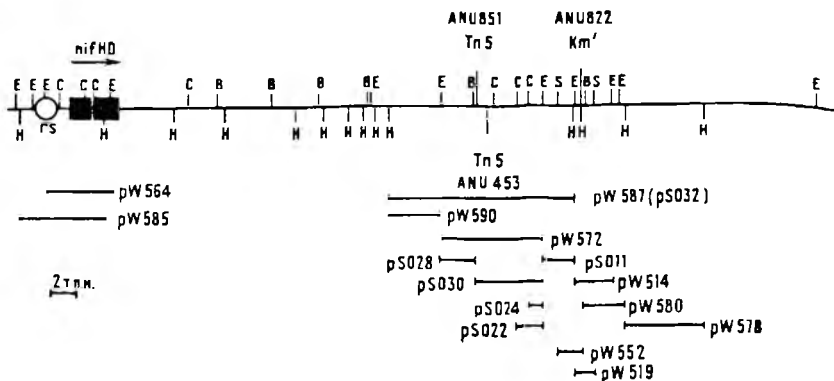


Рис. 23.2. Рестрикционная карта области *Sym*-плазмиды штамма ANU843 *R. trifolii*, контролирующей образование клубеньков и фиксацию азота: C — *ClaI*; E — *EcoRI*; H — *HindIII*; B — *BamHI*; S — *SalI*; rs — повторяющиеся последовательности.

Для более подробного изучения их сцепления были выделены клоны с перекрывающимися *nif*- и *nod*-участками и построена более детальная рестрикционная карта данной области *Sym*-плазмиды. Как показано на рисунке 23.2, анализ таких клонов выявил у штамма ANU843 *R. trifolii* участок *nifHD*, расположенный на расстоянии примерно 20 т. п. н. от участка детерминантов образования клубеньков.

Довольно подробному изучению был подвергнут также *nif*-участок близкородственного штамма *R. trifolii*, ANU329, который был изолирован из банка клонов ДНК *R. trifolii* в бактериофаге λ . Последовательности, гибридизующиеся с *nifH*-геном *K. pneumoniae*, были субклонированы в плаزمиды, чтобы установить полную последовательность ДНК структурных генов нитрогеназы *R. trifolii*. Анализ этой последовательности показал, что гены *nifH* и *nifD* располагаются рядом, как и у свободноживущей бактерии *K. pneumoniae* [5] и быстрорастущего симбионта бобовых *R. meliloti* [4, 7]. Кроме того, первичная структура Fe-белка, кодируемого геном *nifH* *R. trifolii*, и соответствующего белка некоторых других микроорганизмов в высокой степени гомологичны. Эти гомологичные последовательности сосредоточены в специфических участках белковой молекулы, особенно в N-концевом участке и вокруг пяти цистеиновых остатков, которые сохранились у всех исследованных до сих пор азотфиксирующих организмов. Ограничения, налагаемые на аминокислотные последовательности в рассматриваемых участках белка, вероятно, имеют значение для сохранения функции Fe-белка.

При анализе участка *nif* *R. trifolii* было сделано еще одно интересное наблюдение. Когда последовательности, примыкающие к 5'-концу гена *nifH*, использовались в качестве проб для блоттинга геномной ДНК *R. trifolii*, неоднократно наблюдалась гибридизация этой последовательности с несколькими другими рестриктами:

значит, последовательность гена *nifH* около его 5'-конца повторена в геноме несколько раз. Указанная особенность присуща всем исследованным до сих пор штаммам *R. trifolii*, независимо от их географического происхождения. Кроме того, все копии данной последовательности встречаются в *Sym*-плазмиде каждого штамма. В настоящее время ведется работа по определению размера и первичной структуры этого особого класса повторов ДНК.

Участок расположения генов образования клубеньков *R. trifolii* был впервые идентифицирован с помощью Tn5-мутационеза, позволившего выделить два независимых Tn5-индуцированных мутанта (ANU851 и ANU453), у которых проявился дефектный по индукции клубеньков фенотип. Анализ клонированных Tn5-содержащих фрагментов из этих мутантов позволил установить, что в каждом штамме транспозонная вставка локализована в одном и том же участке *Sym*-плазмиды. Точный рестрикционный анализ показал, что положения Tn5-вставок в этих штаммах картируются в пределах 1 т. п. н. друг от друга (рис. 23.2). Чтобы определить границы участка образования клубеньков, был субклонирован *Hind*III-фрагмент длиной 14 т. п. н. (pW587, pSO32; рис. 23.2) из рассматриваемой области *Sym*-плазмиды *R. trifolii* дикого типа. Обратное введение этого фрагмента в мутант ANU843 (ANU845), вычлещенный от крупной *Sym*-плазмиды и, следовательно, неспособный индуцировать клубеньки на клевере, привело к восстановлению этой способности. Поэтому можно считать, что генетическая

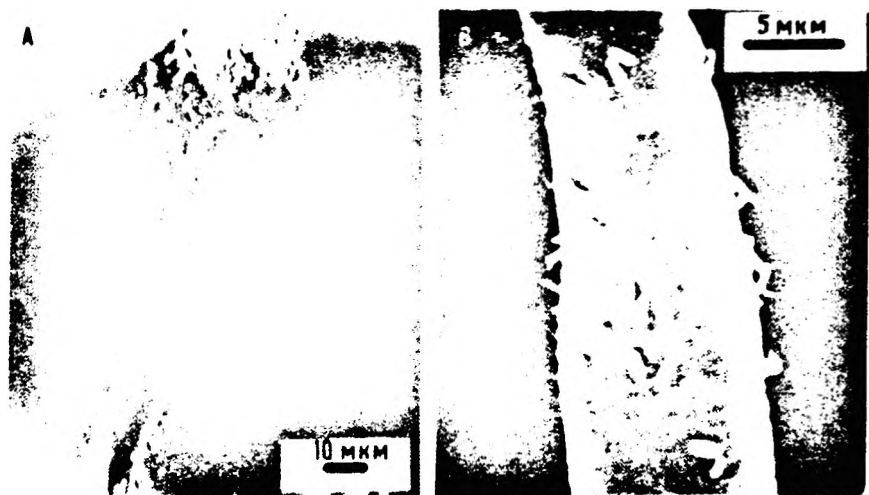


Рис. 23.3. А Штамм ANU843 (дикого типа), заселяющий кончик корневого волоска белого клевера: только что началось скручивание волоска. Снимок сделан с помощью дифференциальной интерференционно-контрастной оптики Номарского. В Микрофотография клеток ANU843 на корневом волоске белого клевера, сделанная с помощью сканирующего электронного микроскопа: обратите внимание на плотность прикрепления некоторых бактерий.

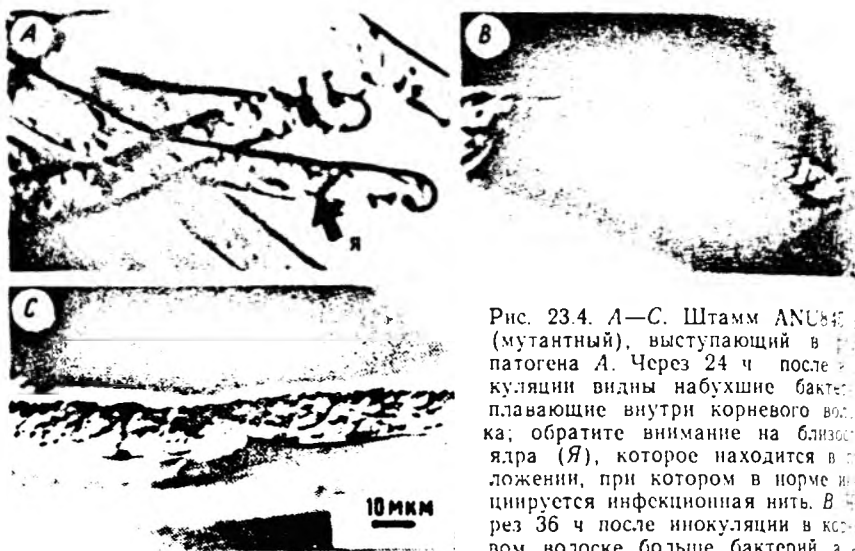


Рис. 23.4. А—С. Штамм ANU845 (мутантный), выступающий в роли патогена А. Через 24 ч после инокуляции видны набухшие бактерии, плавающие внутри корневого волоска; обратите внимание на близость ядра (Я), которое находится в положении, при котором в норме иницируется инфекционная нить. В Через 36 ч после инокуляции в корневом волоске больше бактерий, а степень набухания меньше. С. Через

48 ч после инокуляции бактерии нормального размера образуют колонии внутри волоска. Микрофотография сделана с помощью дифференциальной интерференционно-контрастной оптики Номарского.

информация, необходимая для прикрепления бактерий, скручивания корневых волосков, инициации и ранних этапов развития клубеньков, содержится во фрагменте 14 т. п. н. Кроме того, внесение указанного фрагмента в клетки *A. tumefaciens* придавало этой бактерии способность к формированию клубеньков на белом клевере. Подобные результаты означают, что специфичность по отношению к хозяину по меньшей мере частично определяется функциями, закодированными во фрагменте 14 т. п. н. В настоящее время продолжается изучение более мелких частей ДНК фрагмента 14 т. п. н., цель которого — обозначить границы генов образования клубеньков. Рестрикционный анализ фрагмента 14 т. п. н. позволил выделить внутренний *EcoRI*-фрагмент длиной 7 т. п. н. (рис. 23.2), при внесении которого в клетки ANU845 у них не восстанавливается способность к формированию клубеньков. Однако при микроскопическом исследовании было обнаружено, что этот штамм явно оказывает влияние на корневые волоски, проявляющееся в том, что они заполнены бактериями (рис. 23.3 и 23.4), хотя скручивания корневых волосков или формирования инфекционной нити не происходит. На основании этих данных можно заключить, что фрагмент ДНК 7 т. п. н. кодирует функции, позволяющие бактериям проникать в корневые волоски и расти в них. Но, так как скручивания последних и появления инфекционных нитей не наблюдалось, представляется вероятным, что для контроля инфекции корневых волосков клетками *R. trifolii* необходимы дополнительные функции, закодированные во фрагменте

те 14 т. п. н. Предусматривается попытка более точно определить последовательности, ответственные за образование клубеньков, которые закодированы в изучаемой области ДНК. Нам уже известно, что инсерционные мутации, примыкающие к 3'-концу *HindIII*-фрагмента 14 т. п. н. (например, у ANU822, рис. 23.2), не оказывают никакого влияния на симбиотический фенотип. Понятно, что этот факт не противоречит тому, что в данном фрагменте ДНК содержится информация, кодируемая *Sym*-плазмидой, которая необходима для образования клубеньков.

СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ НИТРОГЕНАЗЫ У ШТАММА *RHIZOBIUM SP. ANU289*, СПЕЦИФИЧНОГО ДЛЯ *PARASPONIA*

Гены *nif* медленно растущего штамма *Rhizobium sp. ANU289*, специфичного для *Parasponia*, также были изолированы из λ -банка геномной ДНК благодаря их гомологии с *nif*-последовательностями *Klebsiella*. Один из таких λ -клонов был подробно охарактеризован, кроме того, определена последовательность ДНК *nifH* и примыкающих к ней участков. Результаты этих исследований позволяют сделать несколько важных выводов. 1. Как и у *R. trifolii*, для Fe-белка, кодируемого геном *nifH*, характерна чрезвычайно высокая гомология с продуктами других Fe-белковых генов. 2. При анализе последовательностей, примыкающих к 5'-концу гена *nifH* (потенциально регуляторные последовательности), близ начала его кодирующего участка обнаружена последовательность, которая весьма сходна с прокариотическим сигналом терминирования транскрипции. Поскольку данная последовательность лежит слишком близко к гену *nifH*, чтобы между ней и началом кодирующей последовательности *nifH* имелось место для отдельного промотора, сразу же было предположено, по аналогии со сходными ситуациями в биосинтетических оперонах *E. coli* [9], что здесь существует некий аттенуирующий механизм. При более внимательном рассмотрении этой последовательности можно видеть, что она действительно обладает всеми чертами, необходимыми для выполнения роли аттенуатора терминирования транскрипции. В ней имеется короткая последовательность, кодирующая пептид, в котором содержатся два смежных глутаминовых остатка. Непосредственно за ней расположен участок с протяженной вторичной структурой, который может определять стебель антитерминаторной или терминаторной шпильки. Возможная роль глутаминовой аттенуации в регуляции выражения гена *nifH* согласуется с данными о том, что в случае штамма *Rhizobium sp. ANU289* добавление глутаминна к азотфиксирующей культуре клеток приводит к очень быстрому подавлению нитрогеназной активности. 3. Анализ последовательности ДНК *nif*-области *Rhizobium sp. ANU289* показывает, что в отличие от всех других изученных до сих пор азотфиксирующих организмов ген *nifD* здесь тесно не сцеплен с геном *nifH*. Кроме того, блоттинг-гибридизация ДНК штамма ANU289 со специфическими последовательностями генов *nifH* или *nifD* *K. pneumoniae*

показывает, что в каждом случае с указанными двумя разными пробами специфически гибридизуются различные рестрикционные фрагменты. Заключение о том, что гены *nifH* и *nifD* этого штамма *Rhizobium* не являются тесно сцепленными, было подтверждено выделением и описанием нескольких *nifD*-клонов. Теперь известно, что *nifH*-ген от *nifD*-гена отделяет расстояние не менее 10 т. п. н., т. е. они, по-видимому, находятся в разных оперонах. В настоящее время ведется работа по выделению мутантов по гену *nifH* штамма ANU289, чтобы выявить влияние специфических мутаций на регуляцию гена *nifH* и понять механизм координированной регуляции генов *nifH* и *nifD* у этого организма.

Благодарности. Авторы хотели бы особо отметить вклад в эту работу доктора Феллоуз, которая недавно погибла в автомобильной катастрофе. Ее работа по выделению и изучению гена *nifD* штамма ANU289 в значительной мере способствовала успеху исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rolfe BG, Gresshoff PM, Shine J (1980) Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Sci Lett* 19:277—284
2. Rolfe BG, Diordjevic MA, Morrison NA, Plazinski J, Bender GL, Ridge R, Tellam JT, Gresshoff PM, Shine J (this vol) Genetic analysis of the symbiotic regions in *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium parasponia*
3. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:191—195
4. Ruvkun GB, Sunderasan V, Ausubel FM (1982) Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *R. meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551—559
5. Scott KF, Rolfe BG, Shine J (1981) Biological nitrogen fixation: primary structure of the *Klebsiella pneumoniae nifH* and *nifD* genes. *J Mol Appl Genet* 1:71—81
6. Scott KF, Hughes JE, Gresshoff PM, Beringer JE, Rolfe BG, Shine J (1982) Molecular cloning of *Rhizobium trifolii* genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *J Mol Appl Genet* 1:315—326
7. Torok I, Kondorosi A (1981) Sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. *Nucleic Acids Res* 9:5711—5723
8. Trinick MJ (1980) Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora*, and their affinities with other rhizobial groups. *J Appl Bacteriol* 49:39—53
9. Yanofsky C (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289:751—758

24. ОБРАЗОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ НА СТЕБЛЕ AESCHYNOMENE: МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ

Р. ЛЕГОЦКИ, А. ИГЛШЕМ и А. САЛАН*

Образование клубеньков на стебле растения *Aeschynomene* впервые описал Хагеруп в 1928 г. Хотя вслед за этой публикацией появились и другие [1, 2, 12, 19], развитие и структура стеблевых клубеньков подробно не исследовались. Стеблевые клубеньки обычно формируются в условиях затопления; вместе с тем стеблевые ризобии способны индуцировать клубеньки на стебле и на корнях и в не затопленной водой почве. Как показали Иглшем и Салан [5], затопление не является предпосылкой образования стеблевых клубеньков.

Из-за наличия хлоропластов в кортикальных клетках стеблевых клубеньков их морфология существенно отличается от морфологии корневых клубеньков. Поскольку один и тот же вид ризобий обладает способностью индуцировать эффективные клубеньки как на корнях, так и на стеблях растения-хозяина, подобная ассоциация ризобий с бобовым растением, по-видимому, представляет собой уникальную систему для сравнительного изучения дифференциации и выражения генов в тканях стебля и корня.

В данной работе рассмотрены два вида леггемоглобинов, названных Lb α и Lb β , выражение генов которых в стеблевых и корневых клубеньках проявляет различия. Будет сообщено также о выделении и клонировании *nif*-генов стеблевых ризобий и о выделении по меньшей мере двух промоторов *nif*-генов, отличающихся друг от друга по эффективности в клетках *E. coli*. Кроме того, будет описано создание библиотеки промоторов стеблевых ризобий, из которых выделено и частично охарактеризовано около 180 индивидуальных промоторных клонов. Размер отобранных клонов, содержащих промоторы, включая *nif*, составляет 200—400 п. н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика стеблевых ризобий

Из клубеньков, спонтанно образовавшихся на стебле растения *Aeschynomene indica*, выращенного в условиях затопления, был выделен штамм стеблевых *Rhizobium*. Культура *Rhizobium* из очищенной колонии, названная стеблевым ризобияльным штаммом

* R. P. Legocki, A. R. J. Eaglesham, and A. A. Szalay, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University, Ithaca NY 14853, USA.

ВТАil, растет на дрожжевой среде с маннитом при 28—30 °С, ее период генерации около 4 ч (М. Стауэрс и А. Иглшем, личное сообщение). Установлено, что два *EcoRI*-фрагмента ДНК упомянутого штамма гибридизуются с участком *nifKDH* *K. pneumoniae* (Р. Хедли, личное сообщение). Ограниченное число фрагментов ДНК, содержащих структурные гены *nif*, у стеблевых *Rhizobium*, а также их высокая скорость роста сходны с характеристиками быстрорастущих ризобий. Бульонные культуры стеблевых ризобий способны индуцировать клубеньки на растении-хозяине после однократного нанесения клеток на стебель.

Структура стеблевых клубеньков

Клубеньки на стеблях *Aeschynomene* имеют диаметр 3—7 мм (рис. 24.1), и их кортикальные клетки содержат множество хлоропластов. Клубеньки появляются примерно через семь дней после инокуляции, спустя еще три недели они полностью дифференцированы и достигают максимального уровня фиксации азота. Через 9—11 дней после инокуляции на срезах клубеньков виден красный пигмент (леггемоглобин). На микроснимках стеблевых



Рис. 24.1. А—С. Клубеньки на стеблях *Aeschynomene*. А. Растение *A. indica*, выращенное без подкормки азотом. В. Растение *A. scabra*, выращенное без подкормки азотом. С. Растение *A. scabra*, выращенное на среде с добавкой 17 мг азота. Указанный масштаб — 1 см.

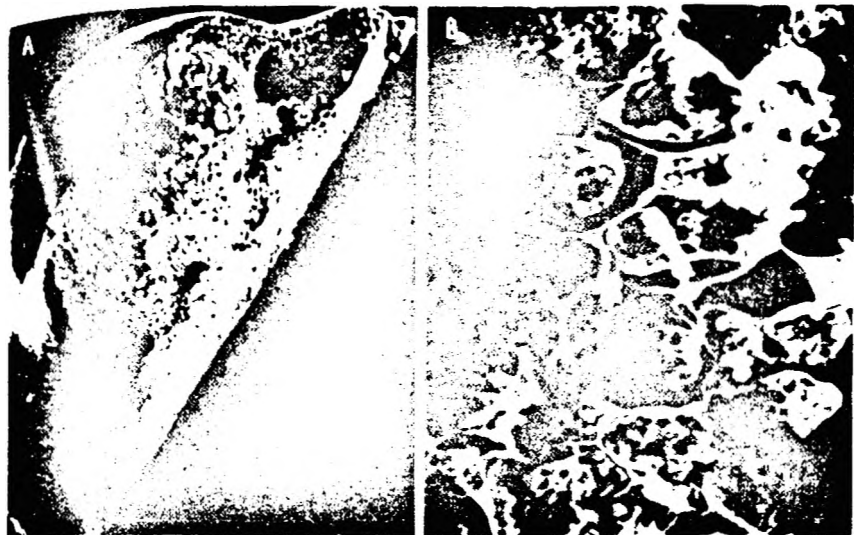


Рис. 24.2. А. В. Микрофотографии стеблевых клубеньков *A. pratensis*, сделанные под сканирующим электронным микроскопом:

А — клубеньки в разрезе; В — присутствие бактериондов в инфицированных клетках растения.

клубеньков, полученных под сканирующим электронным микроскопом, видны бактерионды в инфицированных клетках растения-хозяина, которые располагаются в центральной части клубенька (рис. 24.2). Трансмиссионная электронная микроскопия позволила увидеть в стеблевых клубеньках *A. indica* мембранную оболочку.

Несмотря на то что стеблевой клубенек представляет собой уникальный орган (он локализован на стебле и имеет хлоропласты), период времени, необходимый для формирования таких клубеньков и для обнаружения леггемоглобина, примерно такой же, как в случае корневых клубеньков при симбиозе *Rhizobium* с соей.

Изучение образования клубеньков у *Aeschynomene*

Для выявления специфичности стеблевых *Rhizobium* в отношении хозяев ими инокулировали 16 видов *Aeschynomene* и 10 видов других бобовых, которые обследовали на наличие клубеньков. Результаты, сведенные в таблице 24.1, показывают, что способность стеблевых *Rhizobium* индуцировать клубеньки ограничивается лишь некоторыми видами *Aeschynomene*. Интересно отметить, что у образующих клубеньки видов этого рода они формируются как на стебле, так и на корнях, и ни у одного из них клубеньки не появляются только на стебле или только на корнях (табл. 24.1). Это свидетельствует об участии в процессе образования клубеньков специфических генов растения, выражение которых у *Aeschynomene* не ограничивается только корнями. Поэтому генетическое

24.1. Специфичность формирования клубеньков у стеблевых *Rhizobium*

Проверенная способность к образованию клубеньков	Результат	Виды растений
Индукция клубеньков на корнях и стеблях	Положительный	<i>A. indica</i> , <i>A. scabra</i> , <i>A. rudis</i> , <i>A. e. nia</i> , <i>A. denticulata</i> , <i>A. pratense</i> , <i>A. sensitivia</i>
Индукция клубеньков на корнях и стеблях	Отрицательный	<i>A. brasiliana</i> , <i>A. elegans</i>
Индукция клубеньков только на корнях	Отрицательный	<i>A. afraspera</i> , <i>A. americana</i> , <i>A. falcata</i> , <i>A. fascicularia</i> , <i>A. hystrix</i> , <i>A. paniculata</i> , <i>A. villosa</i> , <i>Thiobolium pratense</i> (софт неизвестен) <i>Medicago sativa</i> (софт Saranak), <i>Pisum sativum</i> (софт Sparkle), <i>Phaseolus vulgaris</i> (софт Red Cloud), <i>Glycine max</i> (софт Wilkin и TGM344), <i>Vigna unguiculata</i> (софт VITA-3 и VITA-5), <i>Arachis hypogaea</i> (софт NC7), <i>Lupinus angustifolius</i> (софт Unicrop), <i>Cajanus cajan</i> (софт CITA-1), <i>Vigna radiata</i> (софт MB33)

изучение видов данного рода, способных и не способных к образованию клубеньков, может являться адекватным подходом к идентификации генов растения, вовлеченных в этот процесс. Не ясно, однако, определяется ли явление формирования клубеньков на стеблях *Aeschynomene* специфическими генами растения или бактерии (или их обоих) в дополнение к генам, управляющим формированием клубеньков на корнях.

В отличие от бобовых, образующих клубеньки на корнях, у *A. scabra*, формирующей клубеньки на стеблях, этот процесс незначительно подавляется высокими концентрациями азота (17 мМ). Азот в концентрации 17 мМ подавляет развитие стеблевых клубеньков, а не инфекционный процесс как таковой, т. е. число клубеньков почти не меняется, а их сухая масса снижается примерно на 85 % [5].

Фиксация азота в клубеньках на стебле

Определение эффективности восстановления ацетилена [10] показало, что активность стеблевых клубеньков составляет 270 мкмоль/(ч·г сухой массы клубеньков), что сравнимо с активностью корневых клубеньков сои или даже превышает ее. Повторная инокуляция растений *Aeschynomene* стеблевыми *Rhizobium* привела к увеличению числа клубеньков (450 на растение), а следовательно, и к возрастанию количества связанного азота в расчете на одно растение (см. также [5]).

Идентификация леггемоглобина

Анализ суммарных цитоплазматических белков растения на стеблевых и корневых клубеньках *A. scabra* с помощью электро-

Рис. 24.3, а, в. Электрофорез в ДСН-полиакриламидном геле растворимых цитоплазматических белков из стеблевых (а) и корневых (в) клубеньков *A. scabra* (окрашено кумасси-голубым). Стрелка указывает на леггемоглобин.

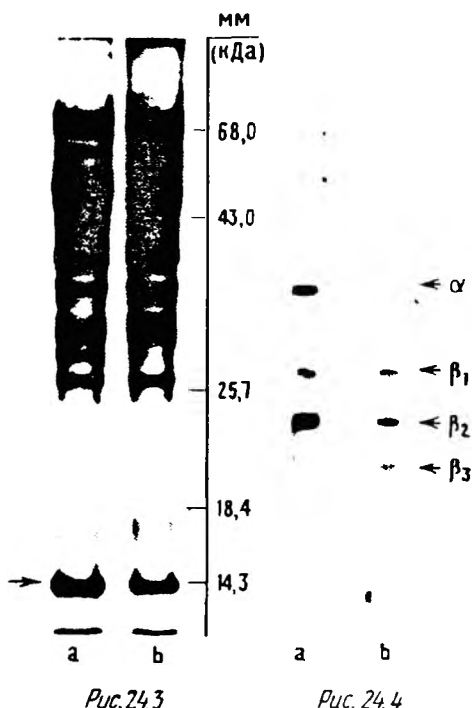


Рис. 24.4, а, в. Изоэлектрическая фокусировка леггемоглобинов, изолированных из стеблевых (а) и корневых (в) клубеньков *A. scabra*. Установлено, что компоненты β_1 , β_2 , β_3 представляют лишь один леггемоглобин (подробности см. в тексте). Гели сфотографированы без окрашивания.

фореза в ДСН-полиакриламидном геле [14] показал наличие в обеих тканях большого количества полипептида с молекулярной массой около 14 500, который оказался леггемоглобином (рис. 24.3, стрелка). Из данных, представленных на рисунке 24.3, можно также заключить, что большинство белков, присутствующих в стеблевых клубеньках, содержатся и в корневых клубеньках. Однако двумерный гель-электрофорез в полиакриламиде [18] свидетельствует, что несколько полипептидов уникальны либо для стеблевой, либо для клубеньковой ткани (данные не представлены).

Просмотр электрофореграмм, аналогичных представленной на рисунке 24.3, показал, что леггемоглобин составляет около 11 и 7% (масса/масса) всей цитоплазмы стеблевых и корневых клубеньков соответственно. Поскольку клубеньки на стеблях *Aeschynomene* содержат хлоропласты, возможно, что необходимо большее количество леггемоглобина, чтобы компенсировать повышенную концентрацию кислорода в этой ткани. При электрофоретическом анализе в неденатурирующих условиях [3] свежих белковых экстрактов из стеблевых и корневых клубеньков *A. scabra* в обеих тканях был обнаружен лишь один компонент. Его значение Rf относительно электрофоретической подвижности леггемоглоби-

нов из клубеньков сои LbS* и LbF** [6] составляют соответственно 0,8 и 0,6.

Изоэлектрическая фокусировка в неденатурирующих условиях [7] в пределах значений pH 5—8 указала на наличие четырех видов молекул леггемоглобина в клубеньках *A. scabra*, обозначенных α , β_1 , β_2 и β_3 (рис. 24.4). Леггемоглобин из каждой полосы был выделен в препаративном количестве, обработан лизирующим буфером, содержащим 9 М мочевины [18], чтобы отделить гем, и подвергнут изоэлектрической фокусировке в денатурирующих условиях [18]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что компоненты β_1 , β_2 и β_3 представляют собой один и тот же леггемоглобин (pI составляет около 7,6), тогда как компонент α отличается от них (pI равно примерно 8,4). Наблюдаемое разделение β -леггемоглобина на три компонента в неденатурирующих условиях предположительно вызвано дифференциальным зарядом гема в его комплексах с железом в водном растворе, о чем сообщалось ранее для сои [7]. Итак, в стеблевых и корневых клубеньках *A. scabra* обнаружены два разных вида молекул леггемоглобина, обозначенных Lb α и Lb β . Анализ очищенных леггемоглобинов с помощью ряда электрофоретических методов, включая двумерный гель-электрофорез в полиакриламиде, указал на присутствие в стеблевых и корневых клубеньках сходных количеств Lb β , в то время как Lb α в ткани стеблевых клубеньков содержится в значительно большем количестве (см. также рис. 24.4). Еще предстоит выяснить, обусловлен ли повышенный уровень Lb α в стеблевых клубеньках большей концентрацией кислорода в этой фотосинтезирующей ткани и различным ли образом регулируется синтез леггемоглобина в ходе развития клубеньков [20, 21] на стеблях и на корнях. Установление первичной структуры леггемоглобинов Lb α и Lb β из стеблевых клубеньков, которое ведется в настоящее время, также может способствовать нашему пониманию особенностей симбиоза в стеблевых клубеньках.

Клонирование генов *nif* стеблевых *Rhizobium*

Электрофорез суммарной ДНК стеблевых *Rhizobium*, расщепленной с помощью *EcoRI*, и последующая гибридизация с пробой *nifKDH* *K. pneumoniae* показали, что *nif*-гены локализованы на двух фрагментах ДНК размером около 28 т. п. н. и 6 т. п. н. (Р. Хедли, личное сообщение). Фрагмент ДНК 28 т. п. н. был выделен с помощью электроэлюции, встроен лигированием [4] в *EcoRI*-сайт плазмиды pSUP201 и использован для трансформации штамма *E. coli* JA 221. Из 329 проанализированных трансформантов один давал сильную гибридизацию с пробой *nifKDH*. Анализ плазмид этого *nif*-содержащего клона (pRL4) указал на наличие

* Электрофоретически медленно движущийся компонент леггемоглобина.

** Электрофоретически быстро движущийся компонент леггемоглобина.

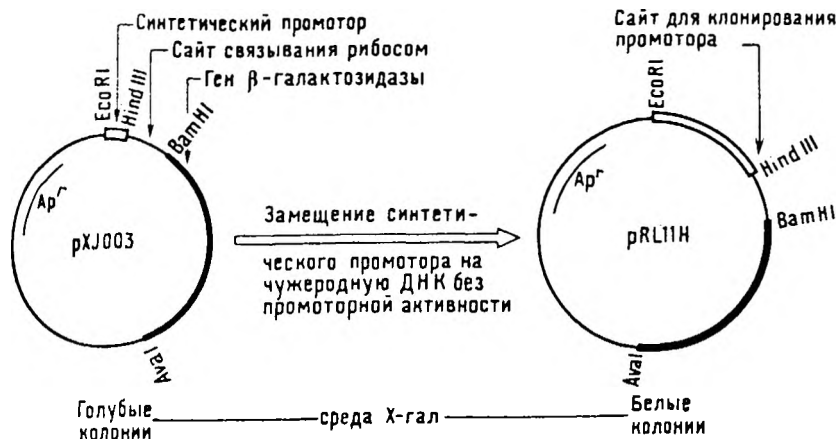


Рис. 24.5. Конструирование β -галактозидазного вектора pRL11H для выявления промоторной активности в клетках *E. coli*.

вставки ДНК 6,7 т. п. н.; это свидетельствует о том, что в ходе клонирования возникла протяженная делеция во фрагменте ДНК 28 т. п. н.

Конструирование вектора для наблюдения активности промоторов

Клонирование и идентификация *nif*-промоторов из клеток стеблевых *Rhizobium*, описанные ниже, выполнены на β -галактозидазном векторе для экспрессии pRL11H, показанном на рисунке 24.5. Синтетический *lac*-промотор, включающий 48 п. н. [11, 16], для экспрессии вектора pXJ003 (Дж. Росси, личное сообщение) был удален и заменен на фрагмент чужеродной ДНК длиной 3,4 т. п. н., не обладающей промоторной активностью, чтобы исключить возможное сквозное считывание с β -лактамазного (пенициллиназного) промотора. Плазмида pRL11H была испытана в штамме *E. coli* MC1061 на агаровых чашках, содержавших X-гал* (белые колонии), а также с помощью теста на фермент β -галактозидазу (см. ниже), чтобы убедиться, что плазмида не обладает промоторной активностью. Данный плазмидный вектор содержит единственный сайт (*Hind*III) для клонирования промоторов, за которым следует сайт для связывания рибосом (длиной 180 п. н.) гена хлорамфениколацетилтрансферазы, ген *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, часть плазмиды pBR322, определяющая устойчивость к ампициллину, и фрагмент чужеродной ДНК 3,4 т. п. н. (рис. 24.5).

Выделение *nif*-промоторов из клеток стеблевых *Rhizobium*

Плазмида pRL4, содержащая *nif*-последовательности стеблевых *Rhizobium*, была подвергнута рестрикционному анализу с по-

* 5-Бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (Сигма), растворенный в диметилформамиде.

мощью 14 различных рестриктирующих эндонуклеаз с последующей блоттинг-гибридизацией по Саузерну полученных фрагментов с ДНК с пробой *nifKDH*. Для выделения промоторов были использованы два фрагмента, обладающие небольшими размерами и дающие интенсивную гибридизацию с *nifKDH* (не показано). *AvaI*-фрагмент 1,5 т. п. н. и *MboII*-фрагмент 1,0 т. п. н. (рис. 24.6).

Чтобы сократить еще больше размеры этих двух *nif*-фрагментов ДНК, их подвергли обработке экзонуклеазой *Bal31* [8] в течение 10 различных промежутков времени. Укороченные продукты обработали обратной транскриптазой AMV [13], чтобы получить тупые концы молекул путем «заполнения» липких концов после добавления синтетических *HindIII*-линкеров смесь ДНК лигировали с вектором для экспрессии *pRL11H*, линейаризованным с помощью *HindIII* (см. выше; см. также рис. 24.6). Продуктом

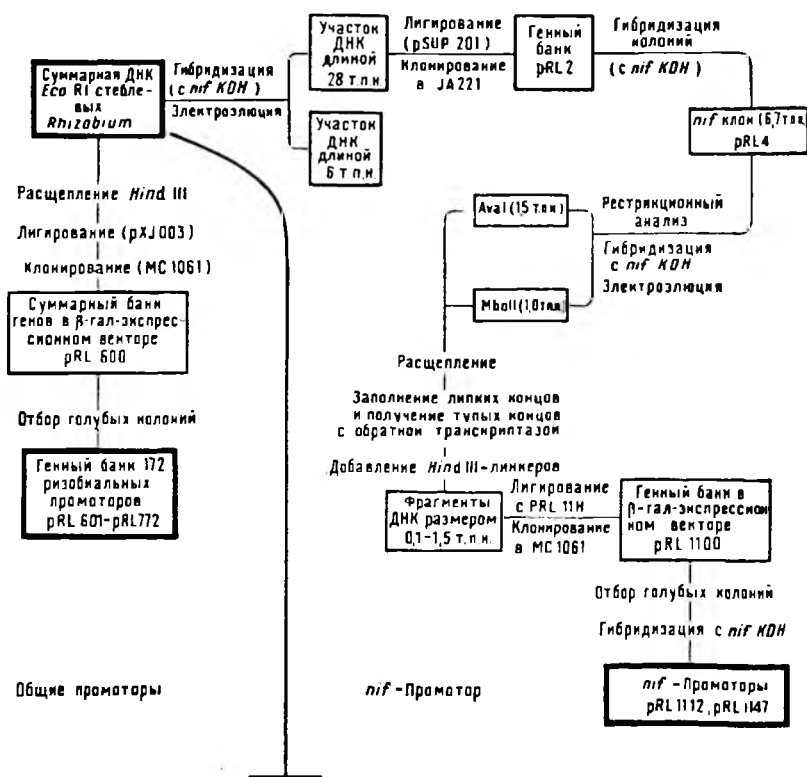
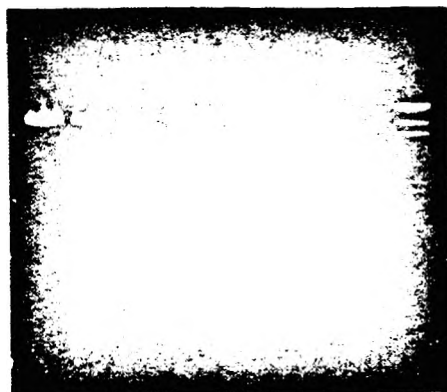


Рис. 24.6. Схема, иллюстрирующая клонирование и выделение двух *nif*-промоторов из стевлевых *Rhizobium* (pRL1112 и pRL1147), а также конструирование большого числа других промоторов стевлевых *Rhizobium* (pRL.601 — pRL772) активных в клетках *E. coli*.

Рис. 24.7. Электрофорез в агарозном геле отобранных промоторных клонов из стеблевых *Rhizobium* (*Hind*III-расщепление):

плазмиды: а — pRL1107; б — pRL1109; в — pRL1111; д — pRL1120; е — pRL1129; ж — pRL1112; з — pRL1147. Дорожки h и i содержат маркеры известных размеров.



а б в д е ж з г h i

лигирования трансформировала *lac*-штамм *E. coli* (MC1061) и отобрали устойчивых к ампициллину трансформантов.

Скрининг на промоторную активность выполнен методом отпечатков устойчивых к ампициллину колоний на агаровые чашки, содержащие минимальную среду M9 с глюкозой [17], в которую добавлено 0,2 % казаминовых кислот, лейцина (49 мкг/мл), X-гал (40 мкг/мл) и ампициллина (100 мкг/мл). Из примерно 4000 проверенных колоний около 70 были голубыми после 20—24-часовой инкубации, 48 из них выбраны для выделения плазмид. После дальнейшего отбора наименьшего по размеру клонированного фрагмента промоторной ДНК, о чем судили по данным рестрикционного анализа, семь исходных трансформантов подвергли более подробному изучению. На рисунке 24.7 показаны профили *Hind*III-расщепленной плазмидной ДНК, извлеченной из отобранных клонов. Размер фрагментов ДНК, содержащих промоторы, варьирует в пределах 250—400 п. н. Гибридизация пробы *nifKDH* с ДНК, представленной на рисунке 24.7, свидетельствует о наличии генов *nif* на двух содержащих промоторы фрагментах (дорожки f и g), обозначенных соответственно pRL1112 и pRL1147 (данные не показаны). Силу клонированных промоторов, включая те, которые не гибридизуются с *nifKDH*, определили с помощью теста на β-галактозилазу [17] в клетках *E. coli*. Данные, представленные в таблице 24.2, а также на рисунке 24.7, показывают, что нет никакой связи между размером фрагмента и его промоторной активностью.

Анализ последовательностей *nif*-промоторов на pRL1112 и pRL1147 из стеблевых *Rhizobium*, а также их активность в клетках *E. coli* в присутствии или отсутствие продукта гена *nifA* будут опубликованы [15].

Примечание при корректуре. Промотор pRL1112 был секвенирован и идентифицирован как промотор гена *nifH*. Сайт инициации транскрипции у продукта слияния *nifH*-промотора с геном *lacZ*, судя по данным картирования с помощью нуклеазы S1, в клетках *E. coli* отличен от соответствующего сайта в бактероидах стеблевых *Rhizobium*. После введения этого составного

24.2. Активность промоторов стеблевых *Rhizobium* (тест на β -галактозидазу)

Плазмида	Время реакции, мин	Поглощение при 600 нм	Поглощение при 550 нм	Поглощение при 420 нм	Единицы на 0,5 мл культуры	Гибридизация с пробой <i>plJKDn</i>
pRL11H	51,0	0,645	0,183	0,317	-0,2	—
pRL1100	71,5	0,537	0,176	0,556	12,0	Не определяли
pRL1107	73,3	0,777	0,223	0,906	18,1	—
pRL1109	75,5	0,742	0,237	1,449	36,9	—
pRL1111	78,3	0,699	0,203	0,995	23,4	—
pRL1112	20,3	0,632	0,180	1,656	208,7	+
pRL1120	5,0	0,696	0,197	1,694	775,4	—
pRL1129	6,3	0,570	0,154	1,381	615,8	—
pRL1147	49,5	0,708	0,201	1,375	58,4	+

элемента транскрипции в хромосому стеблевых *Rhizobium* в клубеньках, индуцированных трансформированными ризобиями, активность β -галактозидазы была значительно выше, чем в клубеньках дикого типа.

Благодарности. Плазмида pSUP201 была любезно предоставлена докторами Р. Симоном и А. Пюлером; плазмида pXJ003 — доктором Дж. Росси. Мы хотим поблагодарить доктора А. Керменди за предоставление нам растительного материала, использованного в настоящей работе. Р. Легоцки выражает благодарность доктору Р. Хедли за ценную помощь и советы в отношении применявшихся методов. Мы благодарны доктору У. Дангриджу за прочтение рукописи.

1. Arora N (1954) Morphological development of the root and stem nodules of *Aeschynomene indica* L. *Phytomorphology* 4:211—216
2. Barrios S, Gonzales V (1971) Rhizobial symbiosis on Venezuelan savannas. *Plant and Soil* 34:707—719
3. Davis BJ (1964) Disc electrophoresis, method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 121:404—427
4. Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* 96:171—184
5. Eaglesham ARJ, Szalay AA (1983) Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. *Plant Sci Lett* 29:265—272
6. Ellfolk N (1972) Leghaemoglobin, a plant haemoglobin. *Endeavour* 31:139—142
7. Fuchsman WH, Appleby CA (1979) Separation and determination of the relative concentrations of the homogeneous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. *Biochem Biophys Acta* 579:314—324
8. Gray HB Jr, Ostrander DA, Hodnett JL, Legerski RJ, Roberson DL (1975) Extracellular nucleases of *Pseudomonas* Bal 31. *Nucleic Acids Res* 2:1459—1492
9. Hagerup O (1928) En hygrofil baelgplante (*Aeschynomene aspera* L.) med bakterieknolde paa stangelen. *Dan Bot Ark* 15:1—9
10. Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43:1185—1207
11. Heyneker HL, Shine J, Goodman HM, Boyer HW, Rosenberg J, Dickerson RE, Narang SA, Itakura K, Lin S, Riggs AD (1976) Synthetic *lac* operator DNA is functional in vivo. *Nature* 263:748—752
12. Jenik J, Kubikova J (1969) Root system of tropical trees. 3. The heterorhizis of *Aeschynomene elaphroxylon* (Guill. et. Perr.) Taub. *Preslia* 41:220—226
13. Kacian DL, Myers JC (1976) Synthesis of extensive, possibly complete, DNA copies of poliovirus RNA in high yields and at high specific activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2191—2195
14. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nat New Biol* 227:680—685
15. Legocki RP, Yun A, Szalay AA (1983) (in preparation)
16. Marians KJ, Wu R, Stawinski J, Hozumi T, Narang SA (1976) Cloned synthetic *lac* operator DNA is biologically active. *Nature* 263:744—748
17. Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
18. O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007—4021

19. Suessenguth K von, Beyerle R (1936) Über Bakterienknöllchen am Spröß von *Aeschynomene paniculata* Willd. Hedwigia 75:234—237
20. Verma DPS, Ball S, Guirin C, Wanamaker L (1979) Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules. Characterization of the nascent and released peptides and the relative rate of synthesis of the major leghemoglobins. Biochemistry 18:476—483
21. Verma DPS, Haugland R, Brisson N, Legocki RP, Lacroix L (1981) Regulation of the expression of leghaemoglobin genes in effective and ineffective root nodules of soybean. Biochem Biophys Acta 653:98—107



**Взаимоотношения в системе
Agrobacterium-растение**

25. ONC- И VIR-ГЕНЫ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ
НА T_i ПЛАЗМИДЕ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Я. ХИЛЛЕ, Я. ВАН КАН и Р. СХИЛЬПЕРОРТ *

ВВЕДЕНИЕ

Способность *Agrobacterium tumefaciens* индуцировать опухоли связана с наличием в бактериальных клетках крупной плазмиды, называемой опухолеендуцирующей (T_i, tumor-inducing) плазмидой [11, 19, 21]. В отсутствие T_i-плазмиды бактерии не способны индуцировать опухоли, и это свойство они обретают вновь при повторном внесении данной плазмиды в клетки. Установлено, что определенный фрагмент T_i-плазмиды, T-область, стабильно встраивается в ядерную ДНК опухоловой клетки [1, 2]. Как часть генома растения, эта ДНК названа T-ДНК. Она транскрибируется с образованием семи полиА-содержащих мРНК [20]; по крайней мере некоторые из них экпивируются и транслируются [17]. На некотором расстоянии от T-области на T_i-плазмиде был найден еще один сегмент, также важный для проявления онкогенной способности бактерий [3, 13]. Этот сегмент не обнаруживается в растительных опухолевых клетках, поэтому полагают, что данный участок экспрессируется в бактериальных клетках. Справедливость такого предположения подтверждается данными генетической комплементации [6, 10]. В этой связи предложено называть его *vir*-областью, чтобы отличать от T-области, несущей гены онкогенности, которые экспрессируются в растительных опухолевых клетках.

Круг хозяев T_i-плазмид ограничен Rhizobiaceae [8], его можно расширить созданием коинтегративных плазмид, состоящих из T_i-плазмиды и плазмиды с широким спектром хозяев. После переноса таких коинтегративов в клетки *E. coli* они обычно утрачивают стабильность [15] и распадаются на исходные T_i-плазмиду и плазмиду широкого спектра хозяев. Поскольку T_i-плазмида не способна реплицироваться в *E. coli*, после распада коинтеграта она утрачивается. Нами изолирована коинтегративная плазмида, составленная из плазмиды R772 широкого круга хозяев группы *IncP-1* и октопиновой T_i-плазмиды (pTiB6), которая отличается

* J. Hille, J. Van Kan, and R. A. Schilperoort, Department of Biochemistry, State University of Leiden, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

стабильностью в клетках как *A. tumefaciens*, так и *E. coli*. Этот коинтегра́т использован для построения *in vivo* R'-плазмид, примененных в комплементационных экспериментах с мутантами по *vir*-области T_i-плазмиды. Коинтегра́т использован также для сайт-специфичного мутагенеза T-области в клетках *E. coli*. Результаты опытов будут обсуждены в связи с использованием T_i-плазмид в качестве векторов для внесения чужеродных генов в растения.

СТАБИЛЬНОСТЬ КОИНТЕГРАТИВНОЙ ПЛАЗМИДЫ R772::T_i

Нашей группой изолировано несколько коинтегра́тов R::T_i. Один из них, коинтегра́тивная плазмида R772::T_iB6 (получившая название pAL969 [9]), полностью стабильна в клетках как *A. tumefaciens*, так и *E. coli*. Когда она находится в клетках *A. tumefaciens*, последние нормально индуцируют опухоли на нескольких видах растений. Для выяснения природы удивительной стабиль-

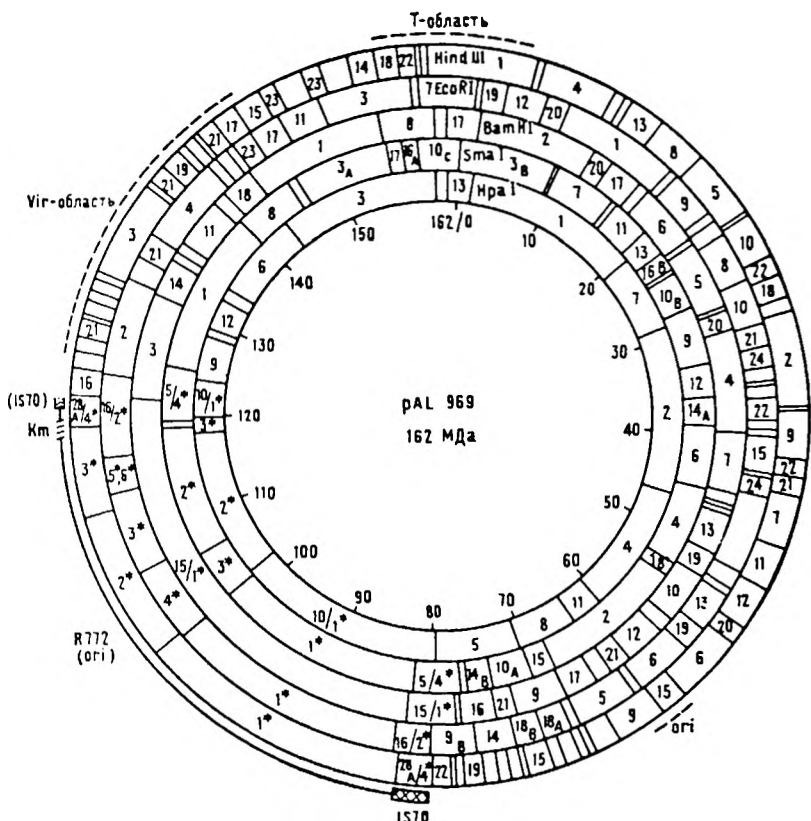


Рис. 25.1. Карта коинтегра́тивной (R772::T_i) плазмиды pAL969. R772-Фрагменты указаны на карте звездочками. Фрагментам составной R772::T_i были присвоены два номера: плазмиды R772 и T_i-плазмиды. Карта T_i-части коинтегра́та дана такой, как описана ранее [18].

ности этой коинтегративной плазмиды мы построили ее физическую карту. Вначале была построена карта плазмиды широкого круга хозяев R772 группы *IncP-1* (молекулярная масса 40 500 000) с помощью 10 различных рестриктаз, с применением двойного расщепления, блоттинг-гибридизации по Саузерну и молекулярного клонирования. При этом в R772 идентифицирован перемещающийся элемент, названный IS70, который был выделен и детально охарактеризован. Молекулярная масса IS70 равна 2 500 000 и, как показало изучение гомодуплекса, на концах он несет инвертированный повтор примерно из 50 п. н. Впоследствии была построена физическая карта коинтегративной плазмиды pAL969 на основе карт R772 и pTiB6. Из карты выяснилось, что коинтеграция R772 произошла в положении IS70. Следовательно, за образование коинтеграта между R772 и pTiB6 ответственна транспозиция элемента IS70, как и предполагали ранее [9]. Для более подробного изучения этого явления IS70 был использован в качестве пробы для блоттинг-гибридизации по Саузерну с плазмидой pAL969. В этом опыте выявлено, что данный элемент присутствует в двойном числе, а именно, на обоих фрагментах, несущих сайты, где соединены R772 и Ti-плазида; следовательно, коинтеграция действительно опосредована элементом IS70. Кроме того, было обнаружено, что лишь одна копия IS70 имеет полный размер, тогда как в другой произошла существенная делеция — от молекулярной массы IS70 осталось не более 500 000 (рис. 25.1). Это наблюдение служит вероятным объяснением стабильности коинтегративной плазмиды, поскольку гомология между полной копией IS70 и его делеционным производным недостаточна для эффективной гомологичной рекомбинации.

КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ *vir*-ГЕНОВ

Мутации Ti-плазмиды в сегменте с молекулярной массой 20 000 000 слева от T-области вызывают авирулентность бактерий, хотя T-область ими не затронута. Если предположить, что этот район, ответственный за вирулентность, экспрессируется в бактерии, то мутации в нем должны комплементироваться в *транс*-положении. Чтобы проверить это предположение, необходимо клонировать фрагменты данного района в плазмиде, которая и реплицируется в агробактерии, и совместима с Ti-плазмидами. Более того, необходимо клонировать крупные фрагменты, поскольку ничего не известно об оперонной структуре и регуляции генов этого района. Недавно описан метод, с помощью которого можно клонировать *in vivo* большие фрагменты плазмидной ДНК [5]. Путем внедрения репликатора R772 в коинтегративную плазмиду R772::TiB6 (pAL969) между двумя копиями транспозона Tn1831 в той же ориентации было получено несколько R'-плазмид. Они несут различные отрезки октопиновой Ti-плазмиды и совместимы с Ti-плазмидами. Наибольшая R' несет почти целую Ti-плазмиду, за исключением участка с молекулярной массой 7 000 000, в кото-

ром локализован репликатор Ti-плазмиды. Агробактерии с этой R'-плазмидой нормально индуцируют опухоли; следовательно, участок репликатора Ti-плазмиды несуществен для индукции опухоли [6]. Путем внесения R' меньших размеров были получены агробактерии, диплоидные по генам, располагающимся в левой половине Ti-плазмиды. Все описанные Tn904-вставки [13] и Tn5-вставки [4] в области генов вирулентности в левой половине октопиновой Ti-плазмиды, вызывающие авирулентность или аттенуированную вирулентность, комплементируются в *транс*-положении [6, 10]. В связи с этим предложено различать *onc*-гены и *vir*-гены. *Onc*(онко)-гены локализованы на T-ДНК, их выражение в опухолевых клетках растения обязательно. *Vir* (вирулентность)-гены, однако, могут комплементироваться в *транс*-положении, это показывает, что они экспрессируются в бактериальных клетках.

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ *onc*-ГЕНОВ

Коинтегративная плазида pAL969 стабильна в клетках *E. coli*. Поэтому можно осуществить сайт-специфичный мутагенез непосредственно в *E. coli* [7]. Фрагмент *EcoRI*-7 T-области был клонирован в векторе pACYC184. *PstI*-фрагмент, локализованный в T-области, был заменен на *PstI*-фрагмент, несущий детерминант *St^r*. Коинтегративная плазида и клон мутированной T-ДНК были совместно внесены в одну клетку *E. coli*, которая впоследствии была использована как донор в скрещивании с реципиентом *E. coli*, не имеющим плазмид. Отбор потомков вели по признаку переноса детерминанта *St^r*. Этот маркер может быть перенесен только путем мобилизации всего мутированного клона T-ДНК под воздействием pAL969 или посредством двойного кроссинговера между гомологичными частями T-области клона T-ДНК и pAL969, что приведет к сайт-специфичному мутагенезу плазмиды pAL969, т. е. внедрению *St^r* в ее T-область. Мобилизация происходила в двух случаях из трех, а в одном случае из трех осуществлялся сайт-направленный мутагенез. Одна из таких направленно-мутированных плазмид была перенесена в клетки агробактерий, и трансконъюгантный штамм испытан на способность индуцировать опухоли. На табаке и каланхоэ развились главным образом корни, что согласуется с положением данной мутации на генетической карте T-области [4, 14], в которой часть локуса, определяющего морфологию опухоли корнеобразующего типа, выпала при *PstI*-замещении. На транскрипционной карте [20] мутирован транскрипт 4 и, возможно, также 6. Эта Ti-плазида была подвергнута дальнейшему мутированию вставкой Tn1831 в транскрипт 2 (локализованный в локусе, определяющем морфологию опухоли побегообразующего типа). Таким образом, плазида теперь содержит мутации T-области в позициях транскриптов 2, 4 и, возможно, 6. Была построена также плазида, мутированная по транскриптам 1, 4 и, возможно, 6. При испытании штаммов *Agrobacterium*, несущих эти плазмиды, оказалось, что они больше не способны индуцировать

опухоли на табаке, томатах и каланхоэ. Можно, однако, задаться вопросом: если такие мутанты утратили способность индуцировать опухоли, то внедряют ли они все-таки Т-ДНК в растительные клетки? В принципе это можно проверить, наблюдая экспрессию гена октопинсинтетазы, закодированного в Т-ДНК, поскольку у названных мутантных плазмид этот локус не затронут мутацией. Однако после инфекции растений такими бактериями опухоли не образуются, поэтому довольно трудно проверить, экспрессируется данный локус или нет. Чтобы преодолеть эту трудность, осуществили смешанную инфекцию в соотношении 1:1 одним из мутантов и штаммом, который обладал нормальной способностью индуцировать опухоли, но имел делецию по локусу октопинсинтетазы. Смешанная инфекция растений томата привела к образованию опухолей с октопинсинтетазной активностью. Эта активность могла быть обусловлена только мутантом; следовательно, хотя несколько *onc*-генов мутировали, перенос и внедрение Т-ДНК в геном растения происходит. Смешанная инфекция проведена с использованием бактерий, несущих *Rec*-мутацию, что исключает возможность того, что после конъюгации бактерий могла иметь место гомологичная рекомбинация в клетках, несущих интактные *onc*-гены и интактный локус октопинсинтетазы, т. е. имеющих Т-область дикого типа. Тем не менее следует учесть возможность незаконной рекомбинации, обусловленной транспозонами. Даже если это так, она происходила с очень низкой частотой и потому заведомо не внесла заметного вклада в индукцию опухолевых клеток, в которых обнаруживается активность октопинсинтетазы. Поскольку *Agrobacteria* конкурируют за ограниченное число сайтов прикрепления на стенках растительных клеток [12, 16], эти сайты должны быть заняты, чтобы произошла индукция опухолевых клеток. Поэтому маловероятно, что немногие *Agrobacteria*, несущие Т-область дикого типа, могли вызвать индукцию хотя одной клетки опухоли в присутствии миллионов мутантных бактериальных клеток.

При использовании интактной *Ti*-плазмиды в качестве вектора для внедрения новых генов в растительные клетки можно с пользой применять стабильную коинтегративную плазмиду *R::Ti*, которая способна реципрокно переноситься между *A. tumefaciens* и *E. coli*. Преимущества *E. coli* как бактерии-хозяина представляются очевидными: у нее гораздо выше скорость роста, имеется огромное число мутантов, для нее созданы специальные клонирующие векторы, такие, как космиды, а также инсерционные активационные векторы. Мы провели сайт-направленный мутагенез коинтеграта *R772::Ti* посредством переноса этой плазмиды и проверки замещения маркера, по которому можно вести отбор. Подобная процедура может быть еще больше упрощена привлечением штаммов *polA* ts. В таких штаммах *col E1*-производные плазмиды могут реплицироваться при 32 °С, но не при 42 °С, хотя другие плазмиды, подобно описанному коинтеграту, при указанных температурах стабильно поддерживаются. Поэтому, если просто вести отбор, например по маркеру устойчивости к какому-либо

антибиотик при 42 °С, можно сразу получить штаммы, которые несут только сайт-направленную мутацию в контегративной плазмиде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263—271
2. Chilton MD, Saiki RK, Yadav N, Gordon MP, Quetier F (1980) T-DNA from *Agrobacterium* Ti-plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4060—4064
3. Garfinkel DJ, Nester EW (1980) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* 144:732—743
4. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
5. Hille J, Schilperoort RA (1981) The use of transposons to introduce well-defined deletions in plasmids: Possibilities for in vivo cloning. *Plasmid* 6:151—154
6. Hille J, Klasen I, Schilperoort RA (1982) Construction and application of R-prime plasmids, carrying different segments of an octopine Ti-plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*, for complementation of *vir*-genes. *Plasmid* 7:107—118
7. Hille J, Kan J van, Schilperoort R (1983) Site-directed mutagenesis in *Escherichia coli* of a stable R772::Ti cointegrate plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 154:693—701
8. Hooykaas PJJ (1979) The role of plasmid determined functions in the interactions of *Rhizobiaceae* with plant cells. A genetic approach. Thesis, Univ Leiden, Netherlands
9. Hooykaas PJJ, Dulk-Ras H Den, Schilperoort RA (1980) Molecular mechanism of Ti-plasmid mobilization by R-plasmids: isolation of Ti-plasmids with transposon-insertions in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 4:64—75
10. Klee HJ, Gordon MP, Nester EW (1982) Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid mutations affecting oncogenicity. *J Bacteriol* 150:327—331
11. Larebeke N Van, Engler G, Holsters M, Elsacker S Van Der, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974) Large plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252:169—170
12. Lippincott BB, Lippincott JA (1969) Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 197:620—628
13. Ooms G, Klapwijk PM, Poulis JA, Schilperoort RA (1980) Characterization of Tn904 insertions in octopine-Ti-plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 144:82—91
14. Ooms G, Hooykaas PJJ, Moolenaar G, Schilperoort RA (1981) Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti-plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene* 14:33—50
15. Picker A De, Block M De, Inzé D, Montagu M Van, Schell J (1980) *Gene* 19:329—338
16. Schilperoort RA (1969) Investigations on plant tumors: Crown gall. Thesis, Univ Leiden, Netherlands
17. Schröder G, Schröder J (1982). *Mol Gen Genet* 185:51—55
18. Vos G De, Beuckeleer M De, Montagu M Van, Schell J (1981). *Plasmid* 6:249—253
19. Watson B, Currier TC, Gordon MP, Chilton MD, Nester EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 123:255—264
20. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) *EMBO J* 1:139—146
21. Zaenen I, Larebeke N van, Teuchy H, Montagu M Van, Schell J (1974). *J Mol Biol* 86:109—127

26. ПЛАЗМИДНЫЕ ГЕНЫ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АГРОБАКТЕРИЙ И РИЗОБИЙ С РАСТИТЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

П. ХОЙКААС *

ВВЕДЕНИЕ

Агробактерии и ризобии представляют собой граммотрицательные почвенные бактерии, относящиеся к бактериальному семейству Rhizobiaceae. Для них характерны своеобразные взаимоотношения с растениями, на основе которых они разделены на два вида. Вид *Agrobacterium tumefaciens* индуцирует опухоли, называемые корончатыми галлами, на многих видах двудольных растений, в то время как вид *A. rhizogenes* индуцирует пролиферацию корней (бородатые корни) у таких растений. Ризобии индуцируют образование азотфиксирующих корневых клубеньков на бобовых и некоторых небобовых растениях (виды *Parasponia*) [75]. Виды ризобий различаются по кругу их хозяев. Вид *Rhizobium trifolii* индуцирует корневые клубеньки на клевере, *R. phaseoli* — на фасоли, *R. leguminosarum* — на горохе и вике, а *R. meliloti* — на доннике и люцерне.

Агробактерии индуцируют опухоли на многих видах двудольных растений [12], но не все штаммы имеют одинаково широкий круг хозяев [59]. Агробактерии инфицируют растения в местах поранений, проникают в растительные ткани, растут и размножаются за счет раневых соков. Агробактерии сорбируются также и на здоровые клетки растения [51, 68], но не проникают в них. Через некоторое время после появления ранки некоторые из здоровых растительных клеток начинают делиться, образуя раневую ткань. В течение небольшого промежутка времени до начала деления клетки растения чувствительны к вызывающему опухоль стимулу, передаваемому прикрепившимися индуцирующими опухоль бактериями (см. обзор [6]). Природа переносимого материала точно не известна, но, по крайней мере частично, он состоит из нуклеиновой кислоты, ибо трансформированные клетки растения содержат последовательность ДНК, Т-ДНК, интегрированную в ядерную ДНК, которая ведет происхождение от плазмиды вызывающей опухоль.

* P. J. J. Hooykaas, Biochemical Laboratory, University of Leiden, Wasserslootweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

вающих опухоль агробактерий [3, 8, 57, 73]. Следовательно, индукция опухолей, вероятно, связана с переносом и последующей интеграцией Т-ДНК в ДНК растения. Клетки корончатых галлов имеют две характерные особенности, которые отличают их от обычных растительных клеток, а именно они автотрофны по фитогормонам [5] и синтезируют опухолеспецифические соединения, называемые опионами (см. обзор [72]).

Ризобии взаимодействуют с растениями совсем по-другому (см. обзор [76]). Они прикрепляются к корневым волоскам растения, которые под их влиянием заметно искривляются. После этого бактерии проникают в ткани корня через инфекционную нить, прорастающую сквозь кору корня. Бактерии, размножающиеся в инфекционной нити, побуждают некоторые клетки коры делиться, что приводит к формированию корневого клубенька. Побудительная причина такого превращения пока неизвестна. В конечном итоге бактерии освобождаются из инфекционной нити в растительные клетки, после чего они видоизменяют свою форму, превращаясь в бактероиды, способные связывать молекулярный азот. В клетках корневых клубеньков растений образуются новые продукты, такие, как фермент леггемоглобин, который выполняет функцию переносчика кислорода в клетках корневых клубеньков и предохраняет нитрогеназу от инактивации под воздействием кислорода.

ПЛАЗМИДЫ

Плазмиды обнаружены в большинстве, если не во всех, штаммах агробактерий и ризобий [7, 54, 84]. Обычно встречается ряд крупных плазмид (> 100 МДа), но иногда клетки могут содержать одну или более плазмид меньшего размера. Роль плазмидных генов во взаимодействиях этих бактерий с клетками растений выявлена в ходе молекулярно-генетических исследований. Для некоторых штаммов *A. tumefaciens* выделены авирулентные варианты путем выращивания клеток при повышенной температуре [24]. Как оказалось, у них утрачена плаزمида с молекулярной массой 120 МДа [50, 78], в которой позднее был выявлен термочувствительный репликатор [66]. Вылеченные штаммы можно опять превратить в патогенные путем скрещиваний в клубеньках или вне растений с вызывающими опухоль донорами [21, 40]. Патогенные варианты приобретали от донора плазмиду, которая в связи с этим была названа Тi-плазмидой, т. е. опухолеродной (tumor-inducing) плазмидой. Установлено, что Тi-плазмиды не только контролируют индукцию опухолей, но и определяют их морфологию и типы синтезируемых в них опинов [4, 32]. Так, можно различить Тi-плазмиды октопинового, нопалинового и нулевого типа. Тi-Плазмиды октопинового и нулевого типа детерминируют шероховатые опухоли на каланхоэ, причем опухоли, индуцированные октопиновыми штаммами, окружены корнями. Нопалиновые штаммы индуцируют на каланхоэ гладкие опухоли [31, 32]. В октопиновых опухолях присутствуют опионы семейства октопинов (например, окто-

пин, лизопин, орнопин, гистопин), а также агропин и маннопин [18, 60]. В нопалиновых опухолях находят опины семейства нопалинов (нопалин, орналин), а кроме того, агроцинопины А и В [16, 60], тогда как в опухолях нулевого типа (т. е. неоктопиновых и ненопалиновых) содержатся агропин, маннопин и агроцинопины С и D [16, 23]. Ti-Плазмиды не только детерминируют синтез в опухолях специфических опинов, но и кодируют катаболическую систему расщепления опинов, синтезируемых в этих опухолях.

Как и для *A. tumefaciens*, для некоторых штаммов *A. rhizogenes* было продемонстрировано, что за индукцию бородачатых корней у растений ответственна плазида. Эта плазида, внесенная в не содержащие плазмиды штаммы *A. tumefaciens* путем скрещиваний как на растениях [1, 52, 79], так и вне растений [11, 36], была названа Ri-плазмидой, т. е. плазмидой, индуцирующей добавочные корни (root-inducing). При индукции бородачатых корней у растений часть Ri-плазмиды включается в ДНК растения [11, 71] и там транскрибируется в РНК [82].

Молекулярно-генетические эксперименты проводились также на различных видах ризобий и показали, что в штаммах *R. trifolii*, *R. leguminosarum* и *R. phaseoli* содержится одна крупная плазида, контролирующая как формирование клубеньков на корнях, так и фиксацию азота [30, 35, 37]. Поэтому такие плазмиды предложено называть Sym-плазмидами, т. е. плазмидами, индуцирующими симбиоз (symbiosis-inducing). Установлено, что у *R. meliloti* гены, контролирующие образование клубеньков и фиксацию азота, локализованы исключительно на больших плазмидах [2, 67].

Блоттинг-гибридизация по методу Саузерна с использованием структурных генов нитрогеназы *K. pneumoniae* в качестве пробы показала, что структурные гены нитрогеназы расположены у ризобий на Sym-плазмидах [30, 49, 55, 63].

ЭКСПРЕССИЯ Ti-, Ri- И Sym-ПЛАЗМИД В НОВЫХ ХОЗЯЕВАХ

Агробактерии и ризобии таксономически близкородственны. Это отчетливо видно при сравнении предварительных хромосомных карт сцепления, построенных для штамма *A. tumefaciens* С58, штамма *R. leguminosarum* 300 и для некоторых штаммов *R. meliloti* [38, 48]. R'-Плазмиды с генами *R. meliloti* можно использовать для комплементации Rec⁺- и Rec⁻-ауксотрофов *A. tumefaciens* ([38] и *неопубликованные данные*). Чтобы выяснить, можно ли относить бактерии к ризобиям или агробактериям, исходя только из состава их плазмид, мы переносили Ti- и Ri-плазмиды из агробактерий в ризобии ([31, 32] и *неопубликованные данные*), а Sym-плазмиды — из ризобий в агробактерии ([35, 37] и *неопубликованные данные*). Перенос Ti-плазмиды (октопинового и нопалинового типа) в любой из ризобиальных видов *R. trifolii*, *R. leguminosarum* или *R. meliloti* давал штаммы трансконъюгантов, способные расщеплять опины. Однако лишь клетки *R. trifolii* или *R. leguminosarum* стали опухолеродными после внесения в них Ti-плазмиды

хотя образовавшиеся опухоли в целом уступали по размеру опухолям, индуцированным клетками агробактерий. Клетки *R. meliloti* после внедрения в них Ti-плазмид оставались непатогенными. Внесение Ri-плазмиды в штамм *R. trifolii* дало клетки, индуцирующие у растений бородачатые корни. Был также проведен перенос в противоположном направлении: Sym-плазмиды из *R. trifolii*, *R. leguminosarum* и *R. phaseoli* переносили в штаммы *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Последние обрели способность индуцировать клубеньки на корнях бобовых растений, но азот в таких клубеньках не связывался, возможно, вследствие неполного выражения генов Sym-плазмид в агробактериях-хозяевах. Круг хозяев, на которых клубеньки индуцировались агробактериями с помощью Sym-плазмиды или ризобияльными штаммами, несущими Ti-плазмиду, определялся исключительно Sym-плазмидой и не расширялся благодаря присутствию Ti-плазмиды (с широким кругом хозяев).

Были созданы также штаммы, содержащие комбинацию двух разных типов плазмид, например Ti-плазмиды и Ri-плазмиды [13, 31], Sym-плазмиды и Ti-плазмиды или Sym-плазмиды и Ri-плазмиды ([31] и *неопубликованные данные*). Присутствие плазмиды одного типа не влияло на выражение плазмиды другого типа. Агробактерии или ризобии с Sym-плазмидой плюс Ti- или Ri-плазмиды индуцируют корневые клубеньки на растениях, образующих часть группы перекрестной инокуляции, определяемой Sym-плазмидой, и индуцируют также корончатые галлы или бородачатые корни (в случае Ri-плазмиды) в местах повреждений у двудольных растений. Однако обнаружено одно исключение из этого правила. Способность штаммов *R. leguminosarum* к образованию клубеньков на горохе резко снижается присутствием в них Ti-плазмиды. Агробактерии с Ri- и Ti-плазмидами индуцируют аберрантные опухоли, из которых вырастают многочисленные корнеподобные структуры; следовательно, обе плазмиды активно трансформируют растительные клетки.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА Ti-ПЛАЗМИД

Физические (с помощью рестриктирующих ферментов) карты построены для октопиновой Ti-плазмиды [9, 56, 77], нопалиновой Ti-плазмиды [61] и Sym-плазмиды *R. leguminosarum* [64]. С помощью различных методов выделено большое число транспозонных и делеционных мутантов этих Ti-плазмид. Положение мутаций установлено с помощью имеющихся физических карт плазмид; сопоставлением фенотипа и генотипа построены генетические карты октопиновой плазмиды pTiB6 [22, 45, 46, 47, 56, 57, 58] и нопалиновой плазмиды pTiC58 [29]. Локализованы гены, ответственные за репликацию и несовместимость, конъюгационный перенос, катаболизм опинов, вирулентность и онкогенность, а также за исключение фага (API). Установлено, что все гены вирулентности и онкогенности занимают около трети Ti-плазмиды, тогда как в остальной ее части располагаются другие гены.

Гены онкогенности локализованы в Т-области — части Тi-плазмиды, которая внедряется в растительные клетки в ходе индукции опухоли. Мутагенез Т-области позволил выявить в ней ряд различных локусов [20, 57], а также последовательность, граничащую с Т-областью, выпадение которой приводит к значительному снижению вирулентности [45, 58]. Т-ДНК в растительных клетках транскрибируется РНК-полимеразой II [81, 83]. Что касается Тi-плазмиды, то обнаружено, что в Т-ДНК содержится ген октопиин-синтетазы — фермента, ответственного за синтез опинов семейства октопинов в опухолевых клетках [53, 69], и по меньшей мере два локуса, которые контролируют дифференцировку растительных клеток [20, 57]. Опухоли, индуцированные на каланхоэ и табаке мутантом одного типа, давали дополнительные побеги, а мутантом второго типа — дополнительные корни. Оба типа мутантов авирулентны на томатах. Поскольку обнаружено, что соотношение между ауксинами и цитокининами контролирует дифференциацию растительных тканей [70], поставлен опыт, цель которого — выяснить, будет ли стимулировать образование опухоли на томатах мутантами этих двух типов обработка растений фитогормонами в ходе индукции опухоли [57]. Образование опухоли мутантами второго типа действительно стимулировалось опрыскиванием растений цитокинином в дневное время, а мутанты, вызывающие образование побегов, положительно реагировали на обработку растений ауксинами в ходе индукции опухоли. Эти данные подтверждают мнение о том, что локусы Т-ДНК ответственны за ауксин- и цитокинин-автотрофный рост клеток корончатых галлов.

Гены вирулентности картированы на участке Тi-плазмиды, непосредственно примыкающем к Т-области ([20, 22, 56] и Хойкаас, *неопубликованные данные*). Этот участок, Vir-область, не был обнаружен в трансформированных клетках, а его гены, вероятно, экспрессируются в бактерии, поскольку большинство мутантов по данной области могут комплементироваться в *транс*-положении R'-плазмидами, несущими сегменты Vir-области ([28, 44] и Хойкаас, *неопубликованные данные*). Можно считать, что гены, расположенные в данной области, играют роль в процессинге Тi-плазмидной ДНК, которую в конечном итоге находят в трансформированных растительных клетках в виде Т-ДНК, в переносе этого материала в растительные клетки, а также, возможно, в подготовке превращения клеток растения в опухолевые клетки.

КОМПЛЕМЕНТАЦИОННЫЕ ОПЫТЫ

Чтобы осуществить комплементационные эксперименты, необходимо сконструировать Res⁻штаммы, диплоидные по специфическому сегменту ДНК. Для *A. tumefaciens* Res⁻-варианты некоторых штаммов были получены ([42] и Молбас, *неопубликованные данные*), но созданию штаммов, диплоидных по сегменту Тi-плазмиды, препятствовала несовместимость между плазмидами. Это затруднение было преодолено построением R'-плазмид, несущих

сегмент Ti-плазмиды, в котором отсутствует Ti-участок, ответственный за репликацию и несовместимость [27, 41]. R'-Плазмиды с сегментами Vir-области оказались способными восстанавливать вирулентность у штаммов, несущих мутации в гомологичной части Vir-области. ДНК области вирулентности Ti-плазмид нопалинового и нулевого типа строго гомологична ДНК этой области октопиновых Ti-плазмид [15, 17, 25]. Поэтому у трех авирулентных мутантов с мутацией по Vir-области их нопалиновой Ti-плазмиды вирулентность была восстановлена с помощью R', несущих части области Vir октопиновой Ti-плазмиды (Хойкаас, *неопубликованные данные*). Октопиновая и нопалиновая Ti-плазмиды образуют стабильный коинтегра́т [34]. Такие штаммы индуцируют опухоли, в которых синтезируются как октопин, так и нопалин, и в растительные клетки из подобных бактерий переносятся оба типа Т-ДНК. Построены также коинтегра́ты из октопиновой и нопалиновой Ti-плазмид, из которых одна или обе содержат мутацию в области Vir, инактивирующую ее (мутация авирулентности) (Хойкаас, *неопубликованные данные*). Штаммы с такими коинтегра́тами также индуцируют опухоли, в которых синтезируются октопин и нопалин, т. е. и в данном случае оба типа Т-ДНК переносятся в растительные клетки. Штаммы с коинтегра́тами авирулентны, если в октопиновой и нопалиновой Ti-плазмидных частях коинтегра́та инактивирована одна и та же функция вирулентности. Ti-Плазмида нулевого типа, rTi542, относится к иной группе несовместимости, нежели октопиновая и нопалиновая Ti-плазмиды ([31] и *неопубликованные данные*). После внесения этой плазмиды в авирулентные штаммы, несущие нопалиновую Ti-плазмиду, они индуцировали опухоли, в которых содержался нопалин. Следовательно, Ti-плазмиды нулевого типа обладают по крайней мере некоторыми функциями вирулентности, аналогичными таковым октопиновых и нопалиновых Ti-плазмид.

Ri-Плазмиды относятся к группе несовместимости (*IncRh-3*), отличной от группы октопин-нопалиновых Ti-плазмид (*IncRh-1*) и Ti-плазмид нулевого типа (*IncRh-2*) ([13, 31] и *неопубликованные данные*). Установлено, что Ri-плазмида проявляет сильную гомологию с некоторыми частями участка вирулентности Ti-плазмид и меньшую гомологию с другими частями [65, 80]. Поэтому при проверке способности Ri-плазмид комплементировать Vir-мутанты октопиновых и нопалиновых Ti-плазмид выяснилось, что некоторые локусы Vir-области комплементируются, тогда как другие — нет (Хойкаас, *неопубликованные данные*). Некоторые Symb-плазмиды были испытаны на гомологию их последовательностей с Ti-плазмидами; оказалось, что в них имеются участки, которые гомологичны небольшим частям области вирулентности [62]. Однако в настоящее время, к сожалению, нет данных комплементационных тестов.

В Т-области октопиновых, нопалиновых и нулевых Ti-плазмид с широким спектром хозяев имеется сегмент высокой гомологии ДНК, «общая последовательность» [10, 61], включающая локусы,

вызывающие ауксиноподобный и цитокининоподобный эффект в клетках растений. Помимо этого сегмента гомологии ДНК, имеются негомологичные участки, занимаемые локусами, которые вовлечены в синтез опинов (по крайней мере, некоторые из них). У Ti-, Ri- и Sym-плазмид с ограниченным кругом хозяев нет участков высокой гомологии с «общей последовательностью», хотя могут содержаться участки с очень слабой гомологией [62, 65, 74, 80, 82]. В опытах по индукции опухолей на томатах обнаружено, что Ri-плазмиды функционально могут комплементировать образующих побеги мутантов, происходящих от октопиновых штаммов. В то время как штаммы, содержащие только одну Ri-плазмиду или октопиновую Ti-плазмиду с мутацией, обуславливающей образование побегов, лишь слабоонкогенны на томатах; штаммы с комбинацией таких плазмид обладают нормальной онкогенностью (Хойкаас, *неопубликованные данные*).

Различные штаммы *Rhizobium* могут нести Sym-плазмиды разного размера и разных групп несовместимости. Установлено, что Sym-плазмиды pSymRtr5 (*R. trifolii*), pSymR1el (*R. leguminosarum*) и pSymRph9 (*R. phaseoli*) совместимы друг с другом, а также с Ti-плазмидами *IncRh-1* и *IncRh-2* и Ri-плазмидами ([35, 37] и *неопубликованные данные*). Поэтому есть основания полагать, что когда будут получены мутанты по Sym-плазмидам, комплементационные эксперименты с ними будут легко осуществимы. Уже известно, что штаммы, несущие две разные Sym-плазмиды, обладают более широким спектром хозяев по образованию клубеньков и фиксации азота, суммирующим спектры обеих Sym-плазмид [14, 35, 37, 39]. У Sym-плазмиды имеются значительные участки гомологии ДНК, которые были картированы на физической карте Sym-плазмиды *R. leguminosarum* pSymR1el [64]. Один большой участок высокой гомологии ДНК разных Sym-плазмид включает гены нитрогеназы.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

В заключение можно постулировать, что фитопатогенные и симбиотические свойства *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii* и *R. phaseoli* в основном определяются их плазмидами. Однако между этими бактериями должны существовать и небольшие хромосомные различия, поскольку Ti-плазмиды индуцируют опухоли более эффективно, когда они содержатся в агробактериях, а не в упомянутых *Rhizobium*, а Sym-плазмиды более эффективно индуцируют корневые клубеньки, когда они присутствуют в *Rhizobium*, а не в агробактериях. У разных типов Ti- и Ri-плазмид имеются (большие) участки гомологии ДНК, в большинстве из которых располагаются локусы, существенные для формирования опухолей; данные комплементационных опытов свидетельствуют о том, что по крайней мере некоторые из функций вирулентности, определяемые Ti- и Ri-плазмидами, аналогичны. Изучение несовместимости показало, что Ti- и Ri-плазмиды можно

разделить не менее чем на 3 разных класса. Это свидетельствует о возможности того, что гены вирулентности и онкогенности оказались сцепленными с плазмидами разных типов путем (незаконной?) рекомбинации в процессе эволюции. То же самое справедливо и для Суп-плазмид: у них имеются большие участки гомологии ДНК, в которых, вероятно, закодированы функции, вовлеченные в установление симбиотической фиксации азота. Однако они совместимы одна с другой. Это свидетельствует о том, что гены симбиоза в процессе эволюции, по-видимому, попали в разные репликоны.

Благодарности. Я признателен доктору Р. Ван-Веену за критическое прочтение рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Albinger G, Beiderbeck R (1977). *Phytopathol Z* 90:306—310
- 2 Banfalvi Z, Sakanyan V, Koncz C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A (1981). *Mol Gen Genet* 184:318—325
- 3 Brauckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981). *Mol Gen Genet* 183:283—288
- 4 Bomhoff G, Klapwijk PM, Kester HCM, Schilperoort RA, Hernalsteens JP, Schell J (1976). *Mol Gen Genet* 145:177—181
- 5 Braun AC (1958). *Proc Natl Acad Sci USA* 44:344—349
- 6 Braun AC (1978). *Plant tumors. Biochim Biophys Acta* 516:167—191
- 7 Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Dénarié J (1979). *J Gen Microbiol* 113:229—242
- 8 Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977). *Cell* 11:263—271
- 9 Chilton MD, Montoya AL, Merlo DJ, Drummond MH, Nutter R, Gordon MP, Nester EW (1978a). *Plasmid* 1:254—269
- 10 Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D (1978b). *Nature* 275:147—149
- 11 Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Tempé J (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into plant roots. *Nature* 295:432—434
- 12 Cleene M De, Ley J De (1976). *Bot Rev* 42:389—466
- 13 Cqstantino P, Hooykaas PJJ, Dulk-Ras H Den, Schilperoort RA (1980). *Gene* 11:79—87
- 14 Djordjevic MA, Zurkowski W, Rolfe BG (1982). *J Bacteriol* 151:560—568
- 15 Drummond MH, Chilton M-D (1978). *J Bacteriol* 136:1178—1183
- 16 Ellis JG, Murphy PJ (1981). *Mol Gen Genet* 181:36—43
- 17 Engler R, Picker A De, Maenhaut R, Villarroel R, Montagu M Van, Schell J (1981). *J Mol Biol* 152:183—208
- 18 Firmin JL, Fenwick GR (1978). *Nature* 276:842—844
- 19 Garfinkel DJ, Nester EW (1980). *J Bacteriol* 144:732—743
- 20 Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981). *Cell* 27:143—153
- 21 Genetello C, Larebeke N Van, Holsters M, Picker A De, Montagu M Van, Schell J (1977). *Nature* 265:561—563
- 22 Greve H De, Decraemer H, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1981). *Plasmid* 6:235—248
- 23 Guyon P, Chilton M-D, Petit A, Tempé J (1980). *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2693—2697
- 24 Hamilton RH, Fall MZ (1971). *Experientia* 27:229—230
- 25 Hepburn AG, Hindley J (1979). *Mol Gen Genet* 169:163—172
- 26 Hernalsteens JP, Greve H De, Montagu N Van, Schell J (1978). *Plasmid* 1:218—225

27. Hille J, Schilperoort (1981). *Plasmid* 6:151—154
28. Hille J, Klasen I, Schilperoort RA (1982). *Plasmid* 7:107—118
29. Holsters M, Silva B, Vliet F Van, Genetello C, Block M De, Dhase Picker A De, Inzé D, Engler G, Villarroel R, Montagu M Van, Schell J (1980). *Plasmid* 3:212—230
30. Hombrecher G, Brewin NJ, Johnson AWB (1981). *Mol Gen Genet* 182:133—136
31. Hooykaas PJJ (1979). Thesis, Univ Leiden, Netherlands
32. Hooykaas PJJ, Klapwijk PM, Nuti MP, Schilperoort RA, Rörsch A (1977). *J Gen Microbiol* 98:477—484
33. Hooykaas PJJ, Dulk-Ras H Den, Schilperoort RA (1980a). *Plasmid* 4:65—70
34. Hooykaas PJJ, Dulk-Ras H Den, Ooms G, Schilperoort RA (1980b). *J Bacteriol* 143:1295—1306
35. Hooykaas PJJ, Brussel AAN Van, Dulk-Ras H Den, Slogteren GMS Van, Schilperoort RA (1981). *Nature* 291:351—353
36. Hooykaas PJJ, Dulk-Ras H Den, Schilperoort RA (1982a). *Plasmid* 8:94—100
37. Hooykaas PJJ, Snijdwint FGM, Schilperoort RA (1982b). *Plasmid* 8:73—82
38. Hooykaas PJJ, Peerbolte R, Regensburg-Tuink AJG, Vries P De, Schilperoort RA (1982c). *Mol Gen Genet* 188:12—17
39. Johnston AWB, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Setchell SM, Hirschinger B, Beringer JE (1978). *Nature* 276:634—636
40. Kerr A, Manigault P, Tempé J (1977). *Nature* 265:560—561
41. Klapwijk PM, Schilperoort RA (1979). *J Bacteriol* 139:424—431
42. Klapwijk PM, Beelen P Van, Schilperoort RA (1979). *Mol Gen Genet* 173:171—175
43. Klapwijk PM, Breukelen J Van, Koorevaar K, Ooms G, Schilperoort RA (1980). *J Bacteriol* 141:129—136
44. Klee JH, Gordon MP, Nester EW (1982). *J Bacteriol* 150:327—331
45. Koekman BP, Ooms G, Klapwijk PM, Schilperoort RA (1979). Genetic mapping of an octopine Ti-plasmid. *Plasmid* 2:347—357
46. Koekman BP, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1980). *Plasmid* 4:184—190
47. Koekman BP, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1982). *Plasmid* 7:119—132
48. Kondorosi A, Vincze E, Johnston AWB, Beringer JE (1980). A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. *Mol Gen Genet* 178:403—408
49. Krol AJM, Hontelez JGJ, Kammen A Van (1982). *J Gen Microbiol* 128:1835—1847
50. Larebeke N Van, Engler G, Holsters M, Elsacker S Van Den, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974). *Nature* 252:169—170
51. Lippincott BB, Lippincott JA (1969). *J Bacteriol* 97:620—628
52. Moore L, Warren G, Strobel G (1979). *Plasmid* 2:617—626
53. Murai N, Kemp JD (1982). *Proc Natl Acad Sci USA* 79:86—90
54. Nuti MP, Ledebouer AM, Lepidi AA, Schilperoort RA (1977). Large plasmids in different *Rhizobium* species. *J Gen Microbiol* 100:241—248
55. Nuti MP, Lepidi AA, Prakash RK, Schilperoort RA, Cannon FC (1977). *Nature* 282:533—535
56. Ooms G, Klapwijk PM, Poullis JA, Schilperoort RA (1980). *J Bacteriol* 144:82—91
57. Ooms G, Hooykaas PJJ, Moolenaar G, Schilperoort RA (1981). *Gene* 14:33—38
58. Ooms G, Hooykaas PJJ, Veen RJM Van, Beelen P Van, Regensburg-Tuink AJG, Schilperoort RA (1982). *Plasmid* 7:15—29
59. Panagopoulos CG, Psallidas PG (1973). *J Appl Bacteriol* 36:233—240
60. Petit A, Delhaye S, Tempé J, Morel (1970). *Physiol Veg* 8:205—213
61. Picker A De, Montagu M Van, Schell J (1978). *Nature* 275:150—153
62. Prakash RK, Schilperoort RA (1982). *J Bacteriol* 149:1129—1134
63. Prakash RK, Schilperoort RA, Nuti MP (1981). *J Bacteriol* 145:1129—1134
64. Prakash RK, Veen RJM Van, Schilperoort RA (1982). *Plasmid* 7:271—280
65. Risuleo G, Battistoni P, Costantino P (1982). *Plasmid* 7:45—51
66. Rogler CE (1980). Plasmid-dependent temperature-sensitive phase in gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2668—2692

67. Rosenberg C, Boistard P, Dénarié J, Casse-Delbart F (1981) Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* 184:326—333
68. Schilperoort RA (1969) Investigations on plant tumors—crown gall. On the biochemistry of tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*. Thesis, Univ Leiden, Netherlands
69. Schröder J, Hillebrand A, Klipp W, Pühler A (1981) Expression of plant tumor-specific proteins in minicells of *Escherichia coli*: a fusion protein of lysopine dehydrogenase with chloramphenicol acetyltransferase. *Nucleic Acid Res* 9:5187—5202
70. Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Biol* 11:118—131
71. Spano L, Pomponi M, Costantino P, Slogteren GMS Van, Tempé J (1982) Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol Biol* 1:291—300
72. Tempé J, Goldmann A (1982) Occurrence and biosynthesis of opines. In: Kahl G, Schell J (eds) *Molecular biology of plant tumors*. Academic Press, London New York, pp 427—449
73. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19:729—739
74. Thomashow MF, Knauf VC, Nester EW (1981) relationship between the limited and wide host range octopine-type Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 146:484—493
75. Trinick MJ (1979) Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can J Microbiol* 25:565—578
76. Vincent JM (1980) Factors controlling the legume-*Rhizobium symbiosis*. In: Newton WE, Orme-Johnson WH (eds) *Nitrogen fixation*, vol II. University Park Press, Baltimore, pp 103—129
77. Vos G De, Beuckeleer M De, Montagu M Van, Schell J (1981) Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor-inducing plasmid pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 6:249—253
78. Watson B, Currier TC, Gordon MP, Chilton M-D, Nester EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 123:255—264
79. White FF, Nester EW (1980a) Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* 141:1134—1141
80. White FF, Nester EW (1980b) Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J Bacteriol* 44:710—720
81. Willmitzer L, Schmalenbach W, Schell J (1981) Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumours is inhibited by low concentrations of α -amanitin. *Nucleic Acid Res* 9:4801—4812
82. Willmitzer L, Sanchez-Serrano J, Buschfeld E, Schell J (1982a) DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Mol Gen Genet* 186:16—22
83. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982b) The t₁-DNA in octopine crown-gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J* 1:139—146
84. Zeaen I, Larebeke N Van, Teuchy H, Montagu M Van, Schell J (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86:109—127

27. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ КРУГА ХОЗЯЕВ У *AGROBACTERIUM*

В. КНАУФ*, М. ЯНОФСКИ*, М. ГОРДОН** и Э. НЕСТЕР*

ВВЕДЕНИЕ

Круг хозяев является важным фактором во взаимоотношениях растений с бактериями. Специфичность, совместимость, узнавание, успешный патогенез, эффективная устойчивость — все это указывает на эволюционно отлаженные механизмы взаимодействия музьяна с патогеном, которые отражаются на круге хозяев. Специфичность круга хозяев у агробактерий — сложное явление. Векруг хозяев у агробактерий, вероятно, включает тысячи разных видов растений [4]. Известные хозяева чаще всего представлены двудольными растениями, однако сообщалось, что и некоторые виды голосеменных восприимчивы к возбудителям корончатых галлов. Спорным остается вопрос, способны ли корончатые галлы развиваться на однодольных растениях [4]. Хотя описаны штаммы *A. tumefaciens*, имеющие узкий круг хозяев [20, 24], почти вся молекулярная биология агробактериального опухолеобразования разрабатывалась на небольшой группе сходных штаммов, которым присущи очень широкие спектры хозяев [22]. В настоящей статье мы обсудим ряд аспектов проявления признака круга хозяев *Agrobacterium*, некоторые эксперименты по идентификации природы генетических локусов, вовлеченных в выражение этого признака, и вероятную основу узкого круга хозяев агробактериального штамма Ag162.

ПРОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКА КРУГА ХОЗЯЕВ У ИЗОЛЯТОВ *A. TUMEFACIENS* С ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ

Мы изучили коллекцию штаммов *Agrobacterium*, изолированных с виноградной лозы (*Vitis vinifera*). Эти изоляты *Agrobacterium* представляют интерес, во-первых, потому, что некоторые из них обнаруживают узкий круг хозяев, а во-вторых, потому, что винограде встречаются три существенно различные разновидности

* V. C. Knauf, M. F. Yanofski, E. W. Nester, Department of Microbiology and Immunology, SC-42, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA

** M. P. Gordon, Department of Biochemistry, SJ-70, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA.

Agrobacterium [24, 27]. Поскольку более совершенная таксономия отсутствует, исходя из биологических тестов, белковых профилей, серологии или гомологии ДНК, почти все штаммы *Agrobacterium* можно отнести к одному из трех биотипов [5, 12, 13]. Биотип 3 агробактериальных штаммов встречается исключительно на виноградной лозе, тогда как биотипы 1 и 2, помимо винограда, обнаружены на многих других растениях.

Ti-Плазмида *Agrobacterium* является основной детерминантой как круга хозяев, так и вирулентности в целом [16, 20, 29]. При переносе Ti-плазмиды из одного штамма *Agrobacterium* в другой передаются и свойства круга хозяев донорного штамма. Штамм *Agrobacterium* C58 [3] обнаруживает очень широкий спектр хозяев. Вылеченный от своей Ti-плазмиды, рTiC58, этот штамм становится совершенно авирулентным. После трансформации авирулентного производного C58 Ti-плазмидой штамма Ag162, имеющей узкий круг хозяев, трансформированный штамм обрел признак узкого круга хозяев штамма Ag162, а не широкого круга хозяев исходного штамма C58. Мы трансформировали двадцатью пятью разными плазмидами октопинового и нопалинового типа изолятов *Agrobacterium* с винограда авирулентный вариант C58, штамм A136 [16]. Почти во всех случаях перенесенная плазмида определяла на генетическом фоне C58 тот же круг хозяев, что и на фоне исходного дикого типа.

Другой аспект признака круга хозяев *Agrobacterium* иллюстрируется на примере штаммов 2/6 и PPI-1. У этих штаммов с широким кругом хозяев он почти один и тот же. Однако штамм PPI-1 способен индуцировать опухоли на *Kalanchoë daigremontiana*, тогда как штамм 2/6 не обладает такой способностью. Из других данных [1] также следует, что у штаммов с широким спектром хозяев этот признак может в некоторой степени варьировать. Это свойство, по-видимому, также определяется Ti-плазмидой, поскольку на генетическом фоне C58 рTiPPI-1 определяет широкий спектр хозяев, включающий каланхоэ, а рTi2/6 — аналогичный по широте спектр, который не включает этот вид.

Два штамма, Ag105 и Ag123, индуцируют опухоли на ряде растений, включая табак (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) и томат (*Lycopersicon esculentum*). Однако в штамме типа C58 ни рTiAg105, ни рTiAg123 не определяют вирулентность на табаке или томатах. Поскольку у штамма Ag123 не удалось выявить каких-либо других плазмид, можно заключить, что хромосомные факторы также играют определенную роль в детерминации круга хозяев. Такое заключение подтверждается результатами транспозонного мутагенеза хромосомы *Agrobacterium*, который привел к появлению штаммов с измененными спектрами хозяев [8].

В сотрудничестве с К. Панагопулосом [16] мы обнаружили, что Ti-плазмиды, такие, как рTiB6 и рTiA6 [26], определяют вирулентность на одних культивируемых сортах винограда и не определяют — на других. Это свидетельствует о том, что по меньшей мере один из факторов растения-хозяина, который определяет воспри-

имчивость к возбудителям корончатых галлов, может варьировать у представителей одного и того же вида растений. Следует отметить, что плазмида рTiAg162 определяет вирулентность штамма на всех тестируемых сортах винограда.

КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ ПРИЗНАКА КРУГА ХОЗЯЕВ КОСМИДНЫМИ КЛОНАМИ ДНК рTiA6

С целью идентификации факторов, кодируемых Ti-плазмидой, которые определяют круг хозяев, изучали штаммы А348 и А856 *Agrobacterium*. Оба штамма содержат хромосому (такую же, как у С58) и крупную криптическую плазмиду [29]; штамм А348 — рTiA6, а штамм А856 — рTiAg162. рTiA6 — плазмида октопин-агропинового типа размером 181 т. п. н., кодирующая широкий круг хозяев, которая исходно была обнаружена в штамме биотипа 1, изолированного в США. рTiAg162 — плазмида октопинного типа длиной 231 т. п. н., кодирующая узкий круг хозяев, которая первоначально была найдена в штамме биотипа 3, изолированного с виноградной лозы, выращиваемой в СССР. Исследование гомологии ДНК показало, что, хотя эти две плазмиды относятся к одной и той же группе несовместимости [15], последовательности ДНК у них разные [17].

Для идентификации детерминант круга хозяев, кодируемых плазмидой рTiA6, клонировали ее фрагменты, а затем вносили их в штамм А856 с узким кругом хозяев. ДНК рTiA6 частично расщепляли рестриктирующей эндонуклеазой *SalI* и клонировали в *SalI*-сайте рVK102, используя систему упаковки *in vitro* фага λ [7]. рVK102 — космидный клонирующий вектор, определяющий устойчивость к канамицину и тетрациклину (рис. 27.1), который можно перенести посредством скрещиваний в *Agrobacterium* и многие другие грамотрицательные бактерии, в которых он стабильно поддерживается [15]. Поскольку рестрикционные карты рTiA6 уже имеются [15], клонированная вставка в каждой рекомбинантной плазмиде была охарактеризована по размеру, организации и положению на карте. Были отобраны космиды со встав-

ками, содержащими перекрывающиеся части рTiA6, чтобы осуществить тест на комплементации для каждого локуса рTiA6 по признакам круга хозяев в штамме А856.

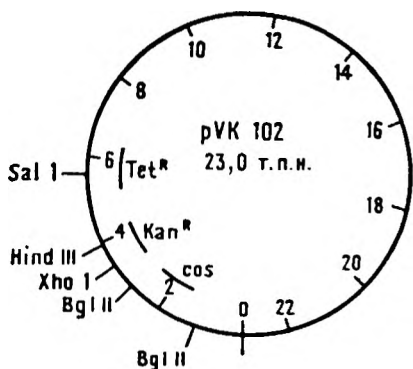


Рис. 27.1. Физическая карта космидного клонирующего вектора широкого круга хозяев рVK102 [15], который обладает такими же репликационными свойствами, как RK2.

Космидные клоны, содержавшие область репликации рTiA6, исключали рTiAg162 из штамма А856 в силу несовместимости плазмид [15], что приводило к авирулентности. И только те клонированные молекулы, которые содержали всю область Т-ДНК рTiA6, расширяли круг хозяев штамма А856, включая в него томат, табак и подсолнечник (рис. 27.2). Эта область представлена участками рTiA6, которые переносятся в растительные клетки, где они стабильно поддерживаются как часть генома клеток корончатого галла [28]. Хотя клонированные вставки рVK231 и рVK245 (рис. 27.2) непосредственно примыкают друг к другу в области Т-ДНК рTiA6, ни один из этих клонов не расширяет круг хозяев штамма А856. Только в том случае, если присутствуют оба *Sall*-фрагмента (1 и 6) плазмиды рTiA6, штамм А856 индуцирует опухоли на табаке, томате или подсолнечнике. Это означает, что критический локус содержит *Sall*-сайт, расположенный между *Sall*-фрагментами 1 и 6. Локус *tms* действительно [9] содержит этот сайт (рис. 27.2) и существен для онкогенности. Поскольку функции Т-ДНК проявляются в ткани растения [10, 31], вполне возможно, что вся Т-ДНК должна содержаться в едином плазмидном репли-

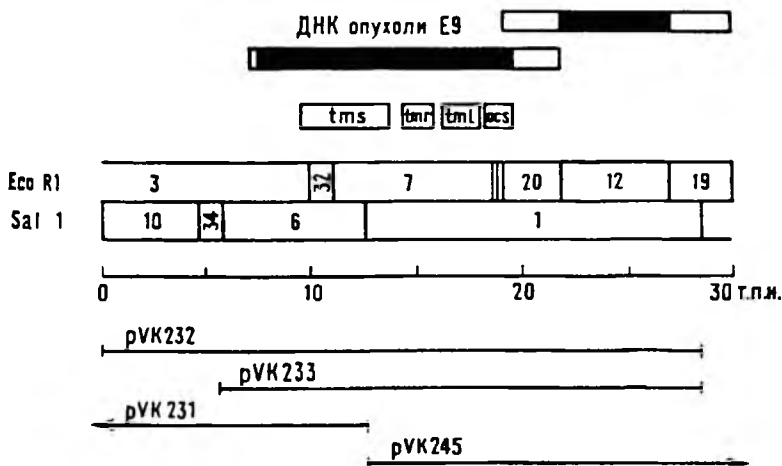


Рис. 27.2. Рекомбинантные клоны, которые расширяют круг хозяев штамма А856. На карте показан лишь участок длиной 30 т. п. н. Ti-плазмиды широкого спектра хозяев рTiA6 (181 т. п. н.). Черными полосками, окруженными неопределенными пограничными участками, изображены районы ДНК рTiA6, обнаруженные в опухолевой линии Е9 табака [28]. Белыми прямоугольниками, помещенными непосредственно под черной полоской, изображены генетические локусы, установленные с помощью транспозонных вставок [9]. Представлены также *EcoRI*- и *Sall*-рестрикционные карты [15]. Линиями, обозначенными рVK232, рVK233, рVK231 и рVK245, показаны участки ДНК рTiA6, клонированные в *Sall*-сайте вектора рVK102. Когда рVK232 или рVK233 присутствовал в штамме А856, имеющем узкий круг хозяев, последний расширялся и включал томат, табак и подсолнечник:

tms — побегообразующий фенотип опухолей на растениях табака; *tms* — корнеобразующий фенотип опухолей на растениях каланхоэ; *tml* — крупные опухоли на растениях каланхоэ; *ocs* — локус октописинтетазы.

коне, чтобы переноситься в растительную клетку, т. е. левый и правый ее «концы» должны граничить с локусами, расширяющими круг хозяев при переносе этой области ДНК. Другая возможность состоит в том, что необходимо координированное действие двух или более локусов ([19], Рим и др., в печати).

Если Т-ДНК рTiA6 способна расширять узкий круг хозяев, определяемый плазмидой рTiAg162 в штамме А856, то что можно сказать о Т-ДНК рTiAg162? Уже имеются данные [17, 30] о том, что рTiAg162 необычная плазида, так как ее последовательности ДНК в малой степени гомологичны с пробам, содержащими так называемую «общую ДНК» [2, 6] — консервативную часть Т-области у большинства изученных к настоящему времени Ti-плазмид. Действительно, гомология ДНК между рTiAg162 и рTiA6 невелика. Однако существуют октопиновые Ti-плазмиды, определяющие широкий спектр хозяев, такие, как рTiAg86, которые близкородственны плазмиде рTiAg162, имеющей отдаленное родство с рTiA6, но проявляющие высокую гомологию с пробой общей ДНК из рTiA6 [15, 16]. В самом деле, все изученные до сих пор Ti-плазмиды, определяющие широкий спектр хозяев, содержат последовательности, гомологичные общей ДНК, тогда как у всех природных авирулентных плазмид и Ti-плазмид, определяющих ограниченный спектр хозяев, подобная гомология отсутствует.

Поскольку имеются рестрикционные карты рTiAg162, основанные на космидных клоновых банках, можно воспользоваться высокоспецифичными пробам из плазмиды рTiA6, чтобы картировать гомологичные последовательности ДНК в рTiAg162. Выяснилось, что по организации Т-ДНК рTiAg162 заметно отличается от рTiA6. При использовании *Vam29*-фрагмента рTiA6 в качестве гибридизационной пробы гомологии между локусом *tms* рTiA6 [9] и рTiAg162 выявлено не было. Отчетливая гомология существует с локусами *tms* и октопинсинтетазы (*ocs*). В рTiA6 гены *tms* и *ocs* отстоят друг от друга на 3 т. п. н., и в корончатом галле они обнаруживаются на одной и той же вставке Т-ДНК. В рTiAg162 эти локусы, определенные по гомологии ДНК, отстоят на 45 т. п. н. (рис. 27.2).

Примечательно, что клоны, содержащие *vir*-локусы рTiA6, не влияли на проявление признака круга хозяев штаммом А856 на испытывавшихся растениях. *vir*-Локусы определяют проявление вирулентности [9, 23]. Так как мутации *vir* в рTiA6 могут комплементироваться в *транс*-положении ([14], Айер и др. в печати), то вероятнее всего выражение генов *vir* имеет место в бактерии. Если только в области Т-ДНК рTiA6 не содержится какого-либо не описанного *vir*-локуса, то способность известных *vir*-локусов комплементировать проявление признака круга хозяев означает, что координированное выражение функций вирулентности не является главным фактором разграничения восприимчивых и устойчивых растений-хозяев. Используя клонированные в космиде фрагменты плазмиды рTiAg162, детерминирующей узкий круг хозяев, нам удалось восстановить вирулентность семи различных *vir*-мутантов

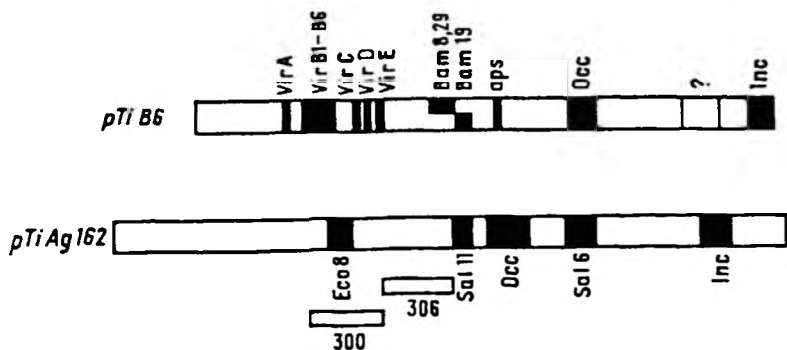


Рис. 27.3. Организация октопиновой Ti-плазмиды, определяющей широкий круг хозяев (pTiB6), и октопиновой Ti-плазмиды, определяющей узкий круг хозяев (pTiAg162). Участки *Vir* содержат локусы, в которых транспозонные вставки приводят к авирулентности [Айер и др., в печати]. Участки *Occ* содержат локусы, определяющие катаболизм октопинов [15]. Участки *Inc* содержат локусы, определяющие несовместимость плазмид. Участки *Bam8, 29* и *Bam19* представляют две части основной T-ДНК плазмид типа pTiB6 и pTiA6 [28]. Участок *Sal11* плазмиды pTiAg162 гомологичен участку *Bam19* pTiB6. *Bam8, 29* pTiB6 гомологичен участку *Sal16* и участку, лежащему непосредственно слева от *Sal11*. Участок *Eco8* pTiAg162 гомологичен участку плазмиды pTiB6 в локусах *virB*. Более того, клонированная ДНК pTiAg162, содержащая участок *Eco8* (прямоугольник, обозначенный цифрой 300), восстанавливает широкий круг хозяев у *virB*-мутантов pTiA6. Клонированная ДНК pTiAg162, изображенная прямоугольником с цифрой 306, комплементирует мутанты *virD* и *virE* pTiA6, восстанавливая широкий круг хозяев, а также вирулентность.

pTiA6 (рис. 27.3). В этих случаях ДНК pTiAg162 восстанавливала вирулентность бактерий на растениях-хозяевах табаке и каланхоэ, несмотря на то что pTiAg162 сама по себе не кодирует вирулентность на этих растениях. Полученные результаты показывают, что *vir*-локусы pTiAg162 могут обеспечивать проявление более широкого круга хозяев, чем закодировано в данной плазмиде.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Природа различий по признаку круга хозяев, определяемых плазмидами pTiA6 и pTiAg162, находит довольно удивительное объяснение. Хотя можно предположить, что какую-то роль здесь играют факторы, присутствующие в бактерии (например, они могут определять прикрепление патогена к клеткам растения-хозяина), оказалось, что неспособность штамма A856 индуцировать опухоли на *Nicotiana tabacum* или *Lycopersicum esculentum* обусловлена T-ДНК pTiAg162, и тем не менее эта ДНК функциональна на *Nicotiana glauca* и *Vitis vinifera*. То, что онкогены pTiAg162 неэффективны на некоторых растениях-хозяева, означает, что отсутствие корончатых галлов на устойчивых растениях-хозяевах нельзя считать доказательством неспособности *Agrobacterium* переносить и внедрять T-ДНК в клетки таких видов растений.

Маловероятно, однако, что все связанные с плазмидой различия по такому признаку, как круг хозяев, обусловлены факторами, закодированными в Т-ДНК. Например, чтобы выяснить, связана ли эта изменчивость с *vir*-локусами или с локусами, содержащимися в Т-ДНК, следует проанализировать различия бактерий по вирулентности на растениях каланхоэ, определяемые непалиновыми плазмидами широкого круга хозяев рTiPP1-1 и рTi2/6. Необходимо обследовать другие штаммы с ограниченным кругом хозяев, чтобы установить, детерминируется ли такой фенотип Ti-плазмидой и содержит ли эта плазмида последовательности, гомологичные той части Т-ДНК, которую до сих пор находили у всех Ti-плазмид широкого круга хозяев [17]. Поскольку транспозонный мутагенез хромосомы *Agrobacterium* вызвал изменение круга хозяев [8], было бы полезно идентифицировать функцию и локализацию в клетке соответствующих генных продуктов дикого типа. Способность трансформировать некоторые виды растений также может оказаться полезным свойством для понимания того, как указанные бактериальные гены оказывают свое влияние на растительные ткани.

Оказалось, что локусы Т-ДНК на отдельном репликоне могут комплементировать признак круга хозяев, следовательно, можно встроить генетический локус в небольшой клонирующий вектор таким образом, что Ti-плазмида мобилизует перенос этого локуса в геном растения. Это был бы значительно более простой подход к анализу выражения генов в растительной ткани, чем применяемый в настоящее время метод замещения маркера [18, 21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson AR, Moore LW (1979) Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69:320—323
2. Chilton M-D, Montoya AL, Merlo DJ, Drummond MH, Nutter R, Gordon MP, Nester EW (1978) Restriction endonuclease mapping of a plasmid that confers oncogenicity upon *Agrobacterium tumefaciens* strain B6-806. *Plasmid* 1:254—269
3. Currier TC, Nester EW (1976) Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of *Agrobacterium*. *J Bacteriol* 126:157—165
4. DeCleen M, DeLey J (1976) The host range of crown gall. *Bot Rev* 42:389—467
5. DeLey J, Tijtgat R, DeSmedt J, Michiels M (1973) Thermal stability of RNA-DNA hybrids within the genus *Agrobacterium*. *J Gen Microbiol* 78:241—252
6. Depicker A, Montagu M Van, Schell J (1978) Homologous DNA sequences in different Ti-plasmids are essential for oncogenicity. *Nature* 275:150—153
7. Enquist L, Sternberg N (1979) In vitro packaging of Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. In: Wu R (ed) *Methods in enzymology*, vol 68. Academic Press, London New York, pp 281—298
8. Garfinkel DJ, Nester EW (1980) Mutants in *Agrobacterium tumefaciens* affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* 144:732—743
9. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, Whit FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
10. Gelvin SB, Thomashow MF, McPherson JC, Gordon MP, Nester EW (1982)

- Sizes and map positions of several plasmid-DNA-coded transcripts in octopine-type crown gall tumors. PNAS 79:76—80
11. Iyer VN, Klee HJ, Nester EW (1983) Units of genetic expression in the virulence region of a plant tumor-inducing plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet (submitted)
 12. Keane PJ, Kerr A, New PB (1970) Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Aust Biol Sci 23:585—595
 13. Kerr A, Panagopoulos CG (1977) Biotypes of *Agrobacterium raciobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Phytopathol Z 90:172—179
 14. Klee HJ, Gordon MP, Nester EW (1982) Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid mutations affecting oncogenicity. J Bacteriol 150:327—331
 15. Knauf VC, Nester EW (1982) Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti-plasmid. Plasmid 8:45—54
 16. Knauf VC, Panagopoulos CG, Nester EW (1982) Genetic factors controlling host range of *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathology 72:1545—1549
 17. Knauf VC, Panagopoulos CG, Nester EW (1983) Comparison of Ti-plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium* isolated from grapevine. J Bacteriol 146:484—493
 18. Leemans J, Shaw C, Deblaere R, DeGreve H, Hernalsteens JP, Maes M, Montagu M Van, Schell J (1981) Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium* Ti-plasmids and transfer of genes to plant cells. J Mol Appl Genet 1:149—164
 19. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, DeGreve H, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. EMBO J 1:147—152
 20. Loper JE, Kado C (1979) Host range conferred by the virulence-specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 139:591—596
 21. Matzke AJM, Chilton M-D (1981) Site specific insertion of genes into the T-DNA of the *Agrobacterium* tumor-inducing plasmid: An approach to genetic engineering of higher plant cells. J Mol Appl Genet 1:39—49
 22. Nester EW, Kosuge T (1981) Plasmid specifying plant hyperplasias. Annu Rev Microbiol 35:531—565
 23. Ooms G, Klapwijk PM, Poulis JA, Schilperoort RA (1980) Characterization of Tn904 insertions in octopine Ti-plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 144:82—91
 24. Panagopoulos CG, Psallidas PG (1973) Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (EF Smith and Townsend). Conn J Appl Bacteriol 36:233—240
 25. Ream LW, Gordon MP, Nester EW (1983) Multiple mutations in the T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid. PNAS (submitted)
 26. Sciaky D, Montoya AL, Chilton M-D (1977) Fingerprints of *Agrobacterium* Ti-plasmids. Plasmid 1:238—253
 27. Süle S (1978) Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. J Appl Bacteriol 44:207—213
 28. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980a) Integration and organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. Cell 19:729—739
 29. Thomashow MF, Panagopoulos CG, Gordon MP, Nester EW (1980b) Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti-plasmid. Nature 283:794—796
 30. Thomashow MF, Knauf VC, Nester EW (1981) Relationship between the limited and wide host range octopine-type Ti-plasmids *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 146:484—493
 31. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) The TL-DNA in octopine crown-gall tumors codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. EMBO J 1:139—146

28. БИОЛОГИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ AGROBACTERIUM RHIZOGENES

Д. ТЕПФЕР *

«Итак, мы видим, что молекулярная биология вне всякого сомнения доказала (причем используя совершенно новый подход) полную независимость генетической информации от событий, происходящих вне или даже внутри клетки, доказала исходя из самой структуры генетического кода и механизмов ее прочтения, что никакая внешняя информация не может проникать в наследуемый генетический текст».

Один из основателей молекулярной биологии, цитированный в книге «Восьмой день творения», Г. Ф. Джадсона, изд-во «Саймон и Шустер», 1979.

ВВЕДЕНИЕ

Считается, что эукариотический геном в норме огражден от информации, закодированной в чужеродной нуклеиновой кислоте. Хорошо известные исключения обусловлены агентами, вовлеченными в генетическую трансформацию: некоторые вирусы и *Agrobacterium tumefaciens*. Последняя содержит эписому, опухолеиндуцирующую (Ti) плазмиду, участок которой — Т-ДНК, или переносимая ДНК, — интегрируется в геном растения в процессе бактериальной инфекции. Недавно обнаружена еще одна Т-ДНК, происходящая от Ri, или корнеиндуцирующей, плазмиды, содержащейся в клетках *A. rhizogenes*. Эта Т-ДНК присутствует в дополнительных корнях, индуцируемых *A. rhizogenes* [2, 11, 12]. Настоящая статья посвящена демонстрации того, что Ri-Т-ДНК в отличие от Ti-Т-ДНК совместима с процессами регенерации и мейоза и что ее присутствие в корнях, в растениях, регенерированных из них, и в потомстве таких растений придает им фенотип, который не только не выглядит вредным, но и указывает на адаптивное значение этой Т-ДНК. Возможность того, что Ri-Т-ДНК кодирует полезную для растения информацию, способную проникать

* D. Tepfer, Laboratoire de Biologie Cellulaire, C. N. R. A., 78000 Versailles, France.

через барьеры, которые предположительно ограждают организмы от чужеродной генетической информации, будет рассмотрена при обсуждении парасексуального генетического обмена, описанного ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Приобретение и передача Т-ДНК. Ri-Плазмида во многом похожа на Ti-плазмиду по способу трансформации растительных клеток, при которой определенный участок ДНК (Т-ДНК) стабильно встраивается в геном растения. Однако Ri- и Ti-Т-ДНК существенно отличаются по их действию на растительные клетки. В данной работе *A. rhizogenes* была использована для индукции корней у трех видов: моркови, табака и вьюнка пурпурного (*Convolvulus arvensis*). Растения регенерировали спонтанно в культуре корней табака и вьюнка пурпурного, а также были получены ис-

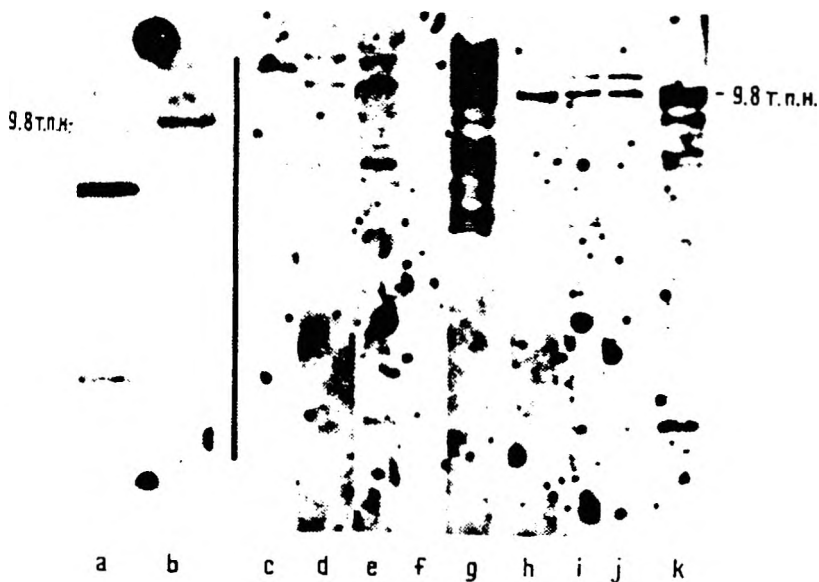


Рис. 28.1. Т-ДНК в корнях, индуцированных *A. rhizogenes*, в растениях, регенерированных из трансформированных корней и в потомстве трансформированных растений:

а — ДНК, выделенная из корней *Convolvulus sepium*, индуцированных штаммом *A. rhizogenes* 8196; гибридизация с ник-транслированной плазмидой из штамма 8196; б — то же, что на дорожке а, но корни индуцированы штаммом А4; с — ДНК табака, выделенная из растений, регенерированных из корней клона № 6, которые были индуцированы оригинальным штаммом А4; гибридизация с плазмидой из А4; д — то же, что и на дорожке с, но использован растительный клон № 4; е — один из потомков растения, представленного на дорожке д, несущий морфологические маркеры трансформации; ф — то же, что на дорожке е, но у потомка не проявляются черты фенотипа *rhizogenes*; г — гибридизация единичной копии, т. е. одна копия плазмиды из штамма А4 на диплоидный генетический материал табака; h — растение *Convolvulus arvensis*, регенерированное из корней клона № 5, индуцированных штаммом А4; i — то же, что на дорожке h, но взят растительный клон, полученный из потомков растения, представленного на дорожке i; k — потомок трансформированного растения моркови, регенерированного эмбриогенезом соматических клеток из корней трансформированных штаммом А4.

кусственно с помощью соматического эмбриогенеза из корней моркови. Т-ДНК содержится в корнях, индуцированных *Agrobacterium*, в растениях, регенерированных из них, и в потомстве трансформированных растений (рис. 28.1).

Фенотип *Rhizogenes*. В аксеничной непрерывной культуре корни, индуцированные *A. rhizogenes*, отличаются от нормальных корней по морфологическим и физиологическим показателям: 1) они быстрее растут; 2) они сильно разветвлены (повышенное апикальное доминирование) и 3) они плагитропичны, т. е. растут в горизонтальном направлении, а не вниз. Благодаря высокой скорости роста они становятся самодезинфицирующимися, поскольку перерастают заразивших их бактерий. Быстрое удлинение корней за счет апикального роста наряду с частым отращиванием боковых корней приводит в итоге к повышенному накоплению биомассы в культуре. В них содержатся различные опины семейства агропинов, определяемые Ri-плазмидой, участвовавшей в трансформации (рис. 28. 2).

Корневые системы содержащих Т-ДНК растений, регенерированных из трансформированных корней, проявляют фенотип *rhizogenes* (рис. 28.3). Надземные части таких растений также модифицированы: 1) листья сморщены (рис. 28.4) — об этом явлении у аналогичных растений впервые сообщил Аккерман [1]; 2) апикальное доминирование снижено, т. е. растения сильно ветвятся (рис. 28.5) и 3) двухлетний вид, морковь, стал однолетним. [Фенологическое превращение двухлетника в однолетник под влиянием Ri-Т-ДНК было подтверждено на эндивии (Туро и Тепфер, *неопубликованные данные*).] В некоторых из таких трансформированных растений

продолжают синтезироваться опины (рис. 28.6). Присутствие Т-ДНК у табака, моркови и вьюнка пурпурного приводит к практически одинаковому фенотипу.

Некоторые из потомков трансформированных растений проявляют фенотип *rhizogenes* содержат Ri-Т-ДНК, в отличие от растений с нормальным фенотипом, которые не содержат Т-ДНК (рис. 28.1). Фенотип *rhizogenes* был использован для изучения наследования



Рис. 28.2, а, б. Опины в растениях *Ononis spinosa* индуцированные штаммом 8196 (а) и штаммом А4 (б) (рис. 28.1 о содержании Т-ДНК в тех же самых корнях).

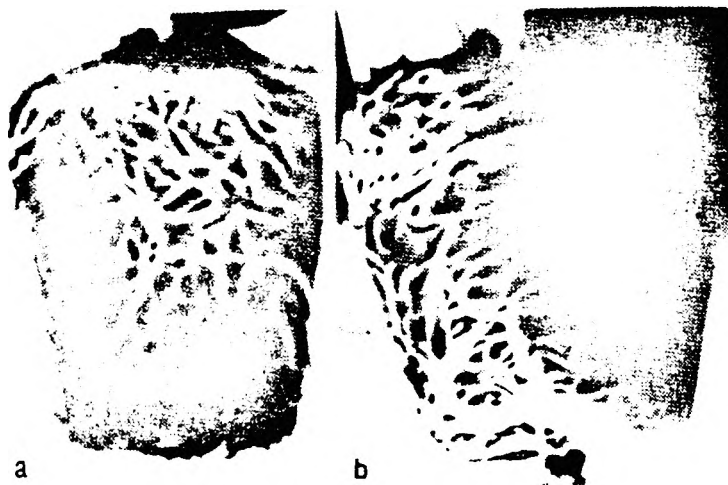


Рис. 28.3. *a, b*. Корневая система растения табака, трансформированного штаммом А4 (*a*), и контрольного растения, регенерированного в культуре из нормальных корней (*b*).



Рис. 28.4. *a, b*. Листья трансформированного штаммом А4 растения табака (*a*) сморщены, а контрольного растения — (*b*) гладкие.

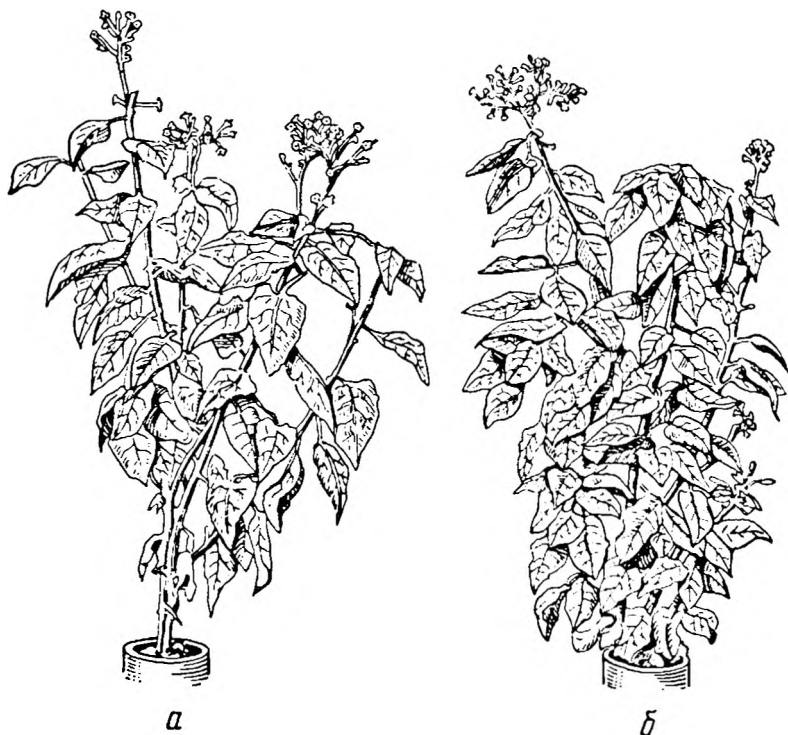


Рис. 28.5, а, б. Зрелые растения табака:
 а — контрольное; б — трансформированное штаммом А4.

Ri-T-ДНК у растений, ведущих происхождение от корневого клона табака № 4. Трансформированное растение, опыленное пылью нормального, дало 35 трансформированных потомков и 31 нормального. Потомство нормального растения, опыленного пылью трансформированного, состояло из 21 трансформированного потомка и 37 нормальных. Самоопыленное трансформированное растение дало 36 трансформированных и 22 нормальных дочерних растения. Такие результаты свидетельствуют о том, что Ri-T-ДНК передается как доминантный менделевский фактор, связанный, однако, с пониженным образованием мужских гаметоцитов (гаметический отбор), — явление, часто наблюдаемое у мутантных растений. В самом деле, у растений, несущих Ri-T-ДНК, способность к завязыванию семян в целом снижена (рис. 28.7). Пыль, взятая у растений клона № 4, *in vitro* прорастает плохо, в отличие от пыльцы других клонов трансформированного табака, которые не обнаруживают также гаметического отбора. Спано и Коститино [7] сообщили о частичной мужской стерильности растений, происходящих из корней, индуцированных клетками *A. rhizogenes*.

Рис. 28.6, а—с. Опины в трансформированном растении *Convolvulus arvensis*:

а — стандартные (сверху вниз) агропин, маниопин и стартовая точка высоковольтного электрофореза; б — опины, выделенные из потомка, трансформированного штаммом А4 растения *C. arvensis*, содержащего Т-ДНК (см. рис. 28.1, дорожка 1); с — опины, выделенные из растения, материнского по отношению к представленному на дорожке б, содержащего ту же Т-ДНК (см. рис. 28.1, дорожка 1) и продуцирующего маниопин, агропин и неизвестное производное агропина.

но не показали достаточно строго, что в них содержится Т-ДНК.

Все компоненты фенотипа *rhizogenes* расщепляются совместно, исключение составляет синтез опинов, который не сохранился ни у одного из потомков трансформированного, синтезирующего опины материнского растения *C. arvensis*, хотя в них присутствует неизменившаяся Т-ДНК (рис. 28.1 и 28.6).

Если не считать пониженную способность к завязыванию семян и наблюдаемую в некоторых случаях частичную мужскую стерильность, нет никаких оснований полагать, что фенотип *rhizogenes* вреден для растений. Ri-Т-ДНК сохраняется в процессе регенерации растений и в мейозе. Ее присутствие коррелирует с фенотипом, который в основном одинаков у трех видов растений. Остается лишь гадать, какое значение имеет такой фенотип в природе.

Можно думать, что растения, регенерирующие из корней естественным путем, как и *Convolvulus arvensis*, могут приобретать Ri-Т-ДНК без вмешательства человека. У тех видов, для которых неизвестна регенерация, это может происходить с низкой частотой или же регенерация у них может индуцироваться присутствием Ri-Т-ДНК.

Вполне правдоподобно, что Ri-Т-ДНК способна направлять формирование добавочной корневой системы при первичной инокуляции, и столь же правдоподобно, что у некоторых видов эта вторичная корневая система может давать начало трансформированному генотипу.

Единственный факт, подтверждающий данную гипотезу, — это легкость, с которой первичная трансформация, регенерация и последующая передача Т-ДНК половым путем осуществляются в лаборатории.

Т-ДНК Ti-плазмиды также может быть встроена в геном растения и передана через мейоз, но только в результате трудоемких лабораторных манипуляций, приводящих к модификации Т-ДНК



Рис. 28.7. Семенные коробочки трансформированного штаммом А4 растения табака (вверху) и нормального растения (внизу).



[5]. В отличие от Ri-T-ДНК Ti-T-ДНК в силу своего онкогенного характера, по-видимому, не может становиться частью генома

растительного вида естественным путем. Поэтому Ri-T-ДНК, вероятно, более пригодна для использования в качестве вектора при внедрении чужеродных генов в растения.

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках ведущейся в настоящее время дискуссии о возможности горизонтального переноса генов, базирующейся на сходстве последовательностей, кодирующих белки, в сходных генах далеко отстоящих видов (см. краткий обзор [3]), будет уместно обсудить экологическое и эволюционное значение Ri-T-ДНК и связанного с ней фенотипа растений. Здесь дан краткий постулат, за которым следует ряд по крайней мере частично проверенных гипотез, первая из которых наиболее правдоподобна, а последняя — наиболее спорна.

Постулат. Изолированные в половом отношении виды растений могут обмениваться генетической информацией, закодированной в специализированных структурах, микромолекулах Т-ДНК, способных встраиваться и исключаться из эукариотических геномов при благоприятном селективном давлении через посредство микроорганизмов.

Гипотеза 1: Ri-T-ДНК обуславливает селективное преимущество

Проникновение *A. rhizogenes* в корни растения и последующее формирование трансформированных корней, приобретающих фенотип *rhizogenes* (пониженное апикальное доминирование и плагиотропизм), приводят к образованию вторичной корневой системы, состоящей из плотно переплетенных корешков, располагающихся вблизи поверхности почвы. Адаптивное значение добавочных корней может заключаться в улучшении закрепления растений, повышении возможности взаимодействия с другими организмами, предохранении от недостатка кислорода при затоплении или, наоборот, защите от засухи. По данным Мура и др. [4], яблони, инфицированные *A. rhizogenes*, лучше противостоят засухе, чем неинфицированные деревья.

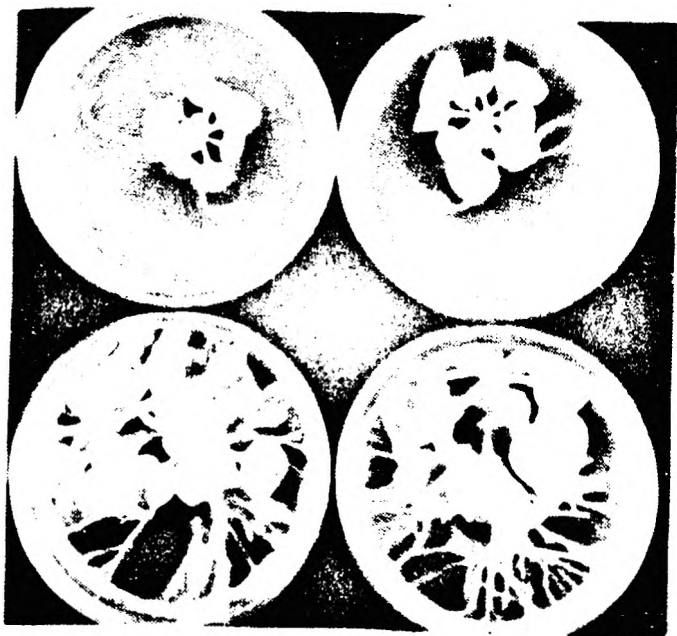


Рис. 28.8. Рост потомства трансформированного табака в запечатанных чашках Петри: растения с нормальным фенотипом, не содержащие Т-ДНК (см. рис. 28.1, дорожка *г*) (вверху), и растения, имеющие фенотип *rhizogenes*, содержащие Т-ДНК (рис. 28.1, дорожка *е*) (внизу).

Подобно селективным преимуществам, обусловленным первичной инокуляцией, можно рассматривать и селективные преимущества *Ri*-фенотипа надземных органов растений. Трансформированные растения табака проявляют пониженное апикальное доминирование, поэтому их крона более разветвлена и облиственна (рис. 28.5), что может улучшать фотосинтетическую способность трансформированных растений. Переключение с двухлетнего образа жизни на однолетний, вероятно, также может оказаться полезным в некоторых условиях среды. Данную гипотезу можно непосредственно проверить, подвергнув трансформированные и нормальные растения воздействию различных средовых стрессов, которые могут способствовать отбору рассматриваемого фенотипа. Предварительные испытания показывают, что можно подобрать условия *in vitro* (рис. 28.8), способствующие образованию проростков табака с фенотипом *rhizogenes*.

Гипотеза 2: в других микроорганизмах существуют другие области Т-ДНК

Другие микроорганизмы также взаимодействуют с растениями. Некоторые из таких взаимодействий (благоприятных или вредных)

могут быть опосредованы парасексуальным генетическим обменом. Вероятным кандидатом в подобные посредники могут быть *Rhizobium*, что обусловлено их таксономическим родством с *Agrobacterium* и специфическим морфогенным эффектом — образованием клубеньков. Еще одним кандидатом на роль рассматриваемых посредников может быть РНК-вирус, возбудитель болезни ризоматоза [6]. Этот вирус содержится в почвенном грибе и вызывает синдром, похожий на фенотип *rhizogenes*: многочисленные сильно-разветвленные корни и сморщенные листья.

Посредничество Т-ДНК в каждом случае взаимодействия микроорганизма — растение можно проверить биохимическими средствами, применяемыми для *Agrobacterium*: выявление наличия Т-ДНК и (или) опинов. Кроме того, среди последовательностей, предположительно общих для Ti- и Ri-Т-ДНК, те, которые нужны для встраивания Т-ДНК в растительную ДНК, могут оказаться пригодными для обнаружения других Т-ДНК в иных системах.

Гипотеза 3 : Ri-Т-ДНК, хотя бы частично, имеет растительное происхождение. ДНК может переноситься из растения в микроорганизм

ДНК растения содержит последовательности, комплементарные Ri-плазмиде [8, 11], точнее, Ri-Т-ДНК (Уайт и др., в печати). Значение подобных гомологий еще не выяснено, но можно предположить, что соответствующие участки содержат генетическую информацию, аналогичную той, которая закодирована в Ri-Т-ДНК. Можно назвать эти Т-ДНК эндогенными в противоположность экзогенной Ri-Т-ДНК, заключенной в бактериальную плазмиду. Логично предположить, что экзогенная ДНК экспрессируется конститутивно, в то время как выражение сходной информации, закодированной в эндогенной Т-ДНК, регулируется и экспрессируется как часть программы развития, например морфогенеза корней, физиологии цветения и т. д. Действительно, различные компоненты фенотипа *rhizogenes* проявляются в природе, например, такие, как сморщенность листьев, реакция на вирусную инфекцию [9] или пролиферация корешков в верхние слои почвы в условиях засухи [10]. Функциональную взаимосвязь между эндогенной и экзогенной Т-ДНК можно исследовать, взяв последнюю в качестве пробы на наличие и выражение ее эндогенного аналога. Данная гипотеза предсказывает, что обе Т-ДНК содержат структурно сходную генетическую информацию и кодируют аналогичные белки, но структуры и механизмы, управляющие их выражением, должно быть, различны.

Поскольку экзогенная и эндогенная Т-ДНК сходны, можно предположить, что: 1) они имеют общее происхождение; 2) эволюционировали независимо и параллельно; 3) эндогенная Т-ДНК ведет свое происхождение из бактерии и стабилизировалась в растении или 4) наоборот, экзогенная Т-ДНК возникла в растении и некогда была перенесена в бактериальную плазмиду. Последнее

объяснение особенно интересно и может быть частично проверено путем включения маркера устойчивости к антибиотику в Ri-T-ДНК в бактерии, переноса T-ДНК вместе с устойчивостью к антибиотику в растение и попытки клонирования в растении этой Ri-T-ДНК обратно в подходящую бактерию с использованием устойчивости к антибиотику как селективируемого маркера.

Гипотеза 4: парасексуальный генетический обмен играет роль в эволюции

Парасексуальный перенос различных T-ДНК из микроорганизмов в растения в условиях, способствующих отбору фенотипа (фенотипов), связанного с T-ДНК, привел бы к одновременному появлению и поддержанию специфических T-ДНК в ряде видов в соответствии с условиями среды. Кроме того, если T-ДНК может вести происхождение из растения и распространяться с помощью микроорганизмов в других видах, то эволюционное значение парасексуального генетического обмена будет возрастать. Сообщество одного вида могло бы приобретать признаки, закодированные в T-ДНК, присущие другому виду. Оба вида должны быть способны взаимодействовать с одним и тем же микроорганизмом-посредником. В связи с этим, устанавливая таксономию парасексуальной эволюции, следует группировать виды по их чувствительности к данному посреднику.

В отсутствие положительного селективного давления распространение Ri-T-ДНК внутри вида, если эффект Ri-T-ДНК на табаке является хорошим примером, будет ограничено гаметическим отбором и общим снижением образования гамет. Следовательно, широкое приобретение фенотипа *rhizogenes* возможно только при условии положительного давления.

Гипотеза 5: патогенные T-ДНК могут служить средством межвидовой борьбы

Наряду с существованием благотворных T-ДНК можно представить себе вид растений, освобождающий набор генов, которые патогенны при включении в ДНК другого вида. Растение может хранить в своем геноме T-ДНК, которая, освобождаясь, инфицирует насекомое, питающееся на этом растении. Такие T-ДНК могут превратиться в вирусы, если они активизируются насекомыми-вредителями, и использоваться как средство защиты растения. Подобно этому могли возникнуть патогены растений (вирусы и Ti-T-ДНК) у вида, устойчивого к собственной инфекции, для защиты от конкурента. Данная гипотеза предсказывает сходство последовательностей у T-ДНК и вирусов, а также существование в составе ДНК растения последовательностей, комплементарных последовательностям вирусов, которые поражают патогенов растений.

Благодарности. Автор выражает признательность своим коллегам по лаборатории клеточной биологии за их великодуш-

ную помощь, в частности Ж. Буржену, М. Тепферу и А. Баннеро за критическое прочтение рукописи, а также Ж. Тампе, в лаборатории которого автор выполнил некоторые эксперименты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ackermann C (1977) Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes*- Tumoren aus *Nicotiana tabacum*. Plant Sci Lett 8:23—30
2. Chilton M, Tepfer D, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature 295:432—434
3. Lewin R (1982) Can genes jump between eukaryotic species? Science 217:42—43
4. Moore L, Warren G, Strobel G (1979) Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmid 2:617—626
5. Otten L, De Greve H, Hernalstiens JP, Van Montagu M, Schieder O, Straub J, Schell J (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 183:209—213
6. Putz C (1981) Etude du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (Beet Necrotic Yellow Vrus) agent de la Rhizomanie. Thesis, Univ Louis Pasteur, Strasbourg
7. Spano L, Costantino P (1982) Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. Z Pflanzenphysiol 106:87—92
8. Tepfer D (1982) La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. 2e Coll Rech Fruit, Bordeaux, pp 47—59
9. Tepfer S, Chessin M (1959) Effects of tobacco mosaic virus on early leaf development in tobacco. Am J Bot 46:496—509
10. Vartanian N (1981) Some aspects of structural and functional modifications induced by drought in root systems. Plant Soil 63:83—92
11. White F, Ghidossi G, Gordon M, Nester E (1982) Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. Proc Natl Acad Sci USA 79:3193—3197
12. Willmitzer L, Sanchez-Serrano J, Buschfield E, Shell J (1982) DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. Mol Gen Genet 18:16—22

29. ВЫРАЖЕНИЕ Т-ОБЛАСТИ ОКТОПИНОВОЙ ПЛАЗМИДЫ рTiAch5 В БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ С ОБРАЗОВАНИЕМ БЕЛКОВ

И. ШРЕДЕР*, В. КЛИПП**, А. ХИЛЛЕБРАНД*,
Р. ЭРИНГ***, К. КОНЧ* и Г. ШРЕДЕР*

ВВЕДЕНИЕ

Т-ДНК в корончатых галлах ответственна за синтез опинов и гормон-независимый рост растительных клеток. Чтобы понять лежащий в основе механизм, необходимо проанализировать цепь событий от генов через транскрипты до белков и их функций. С помощью функционального анализа гены в Т-ДНК были картированы и описаны их транскрипты в растительных клетках (в данной сборнике), однако идентификация белков и анализ их функций оказались трудным делом. Одна из причин подобных затруднений — очень низкая концентрация транскриптов. Попытки идентификации их белковых продуктов показали, что, по крайней мере, некоторые из транскриптов транслируются *in vitro* в определенные белки [12, 13, 17, 18]. В октопиновых опухолях один из белков был идентифицирован как синтезирующий октопин фермент [13, 18], и представляется вероятным, что и другие синтезирующие опины ферменты также закодированы в Т-ДНК. Функции других белков, обнаруженных путем трансляции *in vitro*, неизвестны, кроме того, пока не удалось надежно идентифицировать белковые продукты некоторых транскриптов.

Другой подход к изучению кодируемых Т-ДНК белков — их выделение из трансформированных растительных клеток. Однако такие функции, как индукция и поддержание гормон-независимого недифференцированного роста, присущи не единичным ферментативным реакциям, а сложным морфогенетическим процессам. Ферментативные реакции, участвующие в этих процессах, и, что еще важнее, механизмы их регуляции не выяснены, поэтому не-

* J. Schröder, A. Hillebrand, C. Koncz, and G. Schröder, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abt. Schell, 5000 Köln 30, BRD.

** W. Klipp, Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Postfach 8640, 4800 Bielefeld 1, BRD.

*** R. Ehring, Institut für Genetik, Universität Köln, Weyertal 121, 5000 Köln 41, BRD.

возможно провести функциональный тест, чтобы идентифицировать и выделить такие белки.

Поэтому был разработан другой подход к получению пептидов или белков, закодированных в Т-ДНК. Мы проследили, могут ли части Т-области после слияния с бактериальными генами или самостоятельно экспрессироваться в бактериальных системах с образованием белков [19]. Здесь мы опишем, как Т-область октопиновой плазмиды рTiAch5 может направлять в клетках *E. coli* синтез ряда белков от промоторных последовательностей, находящихся в Т-области. Участки, кодирующие белки, лежат в той же части плазмиды, которая ответственна за гормон-независимый рост трансформированных растительных клеток. Поскольку те же самые белки синтезируются в бесклеточной системе из *Agrobacterium tumefaciens*, представляется вероятным, что они функциональны в клетках агробактерий. Обсуждена возможность того, что выражение соответствующих локусов в бактериях играет роль на ранних этапах образования корончатых галлов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Белок 74 кДа

EcoRI-Фрагмент 7 (рис. 29.1), встроенный в ген устойчивости к хлорамфениколу плазмиды рАСУС184, направляет синтез белка 74 кДа в клетках *E. coli* (рис. 29.2, дорожка 2). Экспрессия обнаружена только в ориентации II фрагмента, в которой транскрипция с вектора переходит в пределы фрагмента Ti-плазмиды слева направо. Это означает, что экспрессия зависит от промотора гена устойчивости к хлорамфениколу и что данный белок, возможно, представляет собой продукт слияния между усеченной частью закодированной в векторе хлорамфениколацетилтрансферазы, получившейся в результате вставки *EcoRI*-фрагмента 7 в рАСУС184, и белком, закодированным в левой части *EcoRI* 7. В предшествующих опытах было показано, что такие составные белки реагируют с антителами против указанного бактериального фермента. Белок 74 кДа не реагирует с подобными антителами и потому, ве-

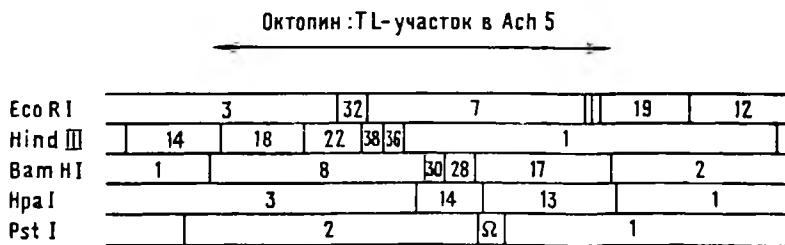


Рис. 29.1. Рестрикционная карта Т-области октопиновой плазмиды рTiAch5 [20]. Линией со стрелками обозначено положение Ti-участка, который наиболее часто встречается в трансформированных клетках растений [1].



Рис. 29.2 Гель-электрофоретический анализ белков, синтезированных в мини-клетках *E. coli* с участием фрагментов ДНК, клонированных в плазмиде рACYC184 (их характеристики даны в табл. 29.1 и на рис. 29.1). Мини-клетки инкубировали, метили и анализировали, как описано в [19]: дорожки: 1 — *EcoRI* 7 (рWK500.1; две разные экспозиции); 2 — *EcoRI* 7 (рWK500.2; две разные экспозиции); 3 — *EcoRI* 7 ($\Delta PstI\Omega$); 4 — *EcoRI* 7 ($\Delta HpaI\Omega$); М — маркерные белки; молекулярной массой в килодальтонах ($M_r \times 10^{-3}$), указанной слева; числа справа — размер белков, синтезированных с участием фрагментов Ti-плазмиды; tet — белок 34 кДа, кодируемый геном устойчивости к тетрациклину на рACYC184.

роятно, не является продуктом слияния. Простейшее объяснение тогда состоит в том, что транскрипция начинается на векторной плазмиде, но сайт связывания рибосом и белок-кодирующий участок располагаются на Ti-плазмидном фрагменте. Это подтверждено Tn5-транспозонным мутагенезом (данные не представлены) и локализацией белок-кодирующего участка на *EcoRI*-фрагменте 7, как показано на рисунке 29.5. Его местоположение было подтверждено также в следующем опыте: *HpaI*-фрагмент в *EcoRI* 7 был удален рестрикцией и последующим лигированием рекомбинантной плазмиды, которая подвергнута тестированию в мини-клетках. Из рисунка 29.2 (дорожка 4) видно, что модифицированная плаزمида дает начало белку 53 кДа, что можно было предсказать, исходя из положения левого *HpaI*-сайта в *EcoRI* 7.

С помощью фрагмента *VamHI* 8 был изучен вопрос о том, может ли белок 74 кДа синтезироваться от промотора T-области. На рисунке 29.5 показано, что в нем содержится около 85% кодирующего участка для белка 74 кДа, а также протяженный отрезок ДНК, простирающийся влево от *EcoRI* 7. При выражении BR322, включающей *VamHI* 8, в мини-клетках синтезировались белки 49 кДа и 66 кДа (рис. 29.3, дорожка 3). Плазмиды, содержащая составной фрагмент, включающий *HindIII*-фрагменты (14-18-22-38), который покрывает две трети левой части *VamHI* 8

29.1. Перечень рекомбинантных плазмид, несущих фрагменты октопиновой плазмиды рTiAch45. Если дана ориентация вставок (ориентация 1 — .1, ориентация 2 — .2), она определена по наличию промотора на векторной плазмиде, которая считывается справа налево (.1) или слева направо (.2) во фрагменте Ti-плазмиды, как он изображен на рисунке 29.1

Рекомбинантная плазмида	Фрагменты Ti-плазмиды	Векторная плазмида	Литературный источник
pGV0219	<i>Hind</i> III (14-18-22-38)	pBR322	[20]
pGV0153	<i>Bam</i> HI 8	pBR322	[20]
pGV0201	<i>Hind</i> III 1	pBR322	[20]
pHD106.1	<i>Hind</i> III 22	pUR51	В данном сборнике
pHD106.2			
pWK500.1			
pWK500.2	<i>Eco</i> RI 7	pACYC184	[19]
pWK500.2 <i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI (Δ <i>Pst</i> I Ω)	pACYC184	В данном сборнике
pWK500.2 <i>Hpa</i> I 14	<i>Eco</i> RI 7 (Δ <i>Hpa</i> I 14)	pACYC184	В данном сборнике

(см. рис. 29.1), направляет синтез белка 49 кДа, но не белка 66 кДа или другого белка сравнимого размера. Это означает, что белок 66 кДа закодирован в правом конце *Bam*HI 8 и что он представляет собой укороченную форму белка 74 кДа. Размер укороченного белка совместим с положением *Bam*HI-сайта в кодирующем участке (рис. 29.5). Поэтому можно заключить, что данный ген может выражаться в *E. coli* от промотора, начиная с Т-области, лежащей слева от *Eco*RI 7.

Белок 49 кДа

Плазмида pBR322, содержащая участок Ach5 *Hind*III (14-18-22-38), направляет синтез белка 49 кДа в мини-клетках *E. coli* (рис. 29.3, дорожка 2), который образуется также при участии

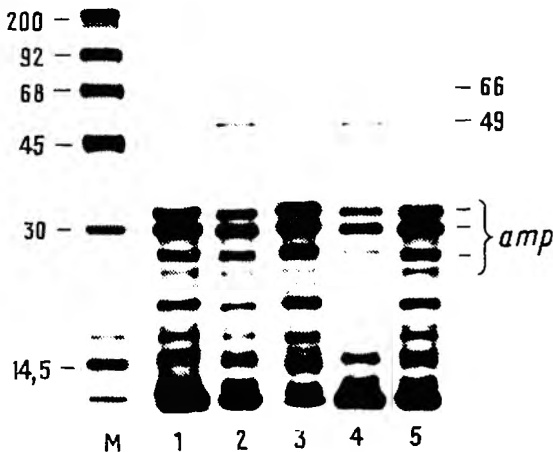


Рис. 29.3. Гель-электрофоретический анализ белков, синтезированных в мини-клетках *E. coli*.

дорожки: 1 — контроль (pBR322); 2 — *Hind*III (14-18-22-38) (pGV0219); 3 — *Bam*HI 8 (pGV0153); 4 — *Hind*III 22 (pHD106.1); 5 — контроль (pUR51, [16]); 6 — контроль. Размеры в килодальтонах (кДа) белков синтезированных с участком фрагментов Ti-плазмиды; *amp* — белки, кодируемые генами устойчивости к ампициллину плазмиды pBR322 и pUR51. Остальные подробности см. в подписи к рисунку 29.1

*Bam*HI 8 (рис. 29.3, дорожка 3). Этот белок не синтезировался при участии плазмид, содержащих отрезки *Hind*III 14 или 18, клонированных отдельно или совместно, следовательно, данный ген находится на отрезке *Hind*III 22 или близ него. Повторное клонирование фрагмента *Hind*III 22 и последующее выражение его в мини-клетках привели к синтезу рассматриваемого белка полной длины (рис. 29.3, дорожка 4). Следовательно, весь кодирующий участок содержится в указанном фрагменте. Выражение не зависело от ориентации вставки в векторной плазмиде, что указывает на транскрипцию с промотора, содержащегося в пределах *Hind*III 22. Тот факт, что с фрагментов *Bam*HI 8 и *Hind*III (14-18-22-38) считывается один и тот же белок, хотя они заключают в себе длинные отрезки ДНК из Т-области справа или слева от *Hind*III 22, свидетельствует в пользу вывода о том, что промоторная активность вектора не нужна для считывания белка 49 кДа.

Белки 28 кДа и 27 кДа

Эти два белка синтезируются с участием фрагмента *Eco*RI 7, клонированного в рАСУС184 (рис. 29.2, дорожки 1, 2). Экспрессия не зависит от ориентации вставки в векторной плазмиде, следовательно, транскрипция начинается в пределах фрагмента Т-области. Поскольку левая часть *Eco*RI 7 кодирует белок 74 кДа, а правый конец — карбоксиконцевую часть октопинсинтезирующего фермента [19], представлялось вероятным, что указанные два белка закодированы в средней части фрагмента. Это было подтверждено в следующих опытах: из фрагмента *Eco*RI 7 посредством рестрикции и последующего лигирования был удален небольшой *Pst*I-фрагмент и полученная плаزمида была исследована в мини-клеточной системе. Данные, представленные на рисунке 29.2 (дорожка 3), показывают, что синтез белка 28 кДа сохраняется, а полного белка 27 кДа — нет. Хотя вопрос дальше не исследовался, можно полагать, что наблюдаемые белки представляют собой укороченные формы белка 27 кДа. На основании этого можно предположить, что в удаленном *Pst*I-фрагменте содержится лишь часть соответствующего гена. Это подтверждено удалением *Hpa*I-фрагмента с помощью рестрикции и религирования. Результаты, представленные на рисунке 29.2 (дорожка 4), показывают, что это привело к возникновению укороченного белка 74 кДа и исчезновению белков 27 кДа и 28 кДа. Это означает, что часть гена для меньшего белка локализована в участке перекрывания *Hpa*I/*Pst*I, как изображено на рисунке 29.4. Ген, кодирующий белок 28 кДа, целиком лежит слева от *Pst*I-фрагмента, так как его удаление не отстранило образование этого белка. Полученные результаты, по-видимому, исключают возможность того, что два данных белка являются разными формами одного белка, кодируемого одним геном, однако не исключено, что рассматриваемые два гена перекрываются. Для более точного картирования кодирующего участка белка 28 кДа необходимы дальнейшие исследования.

pTi Ach 5

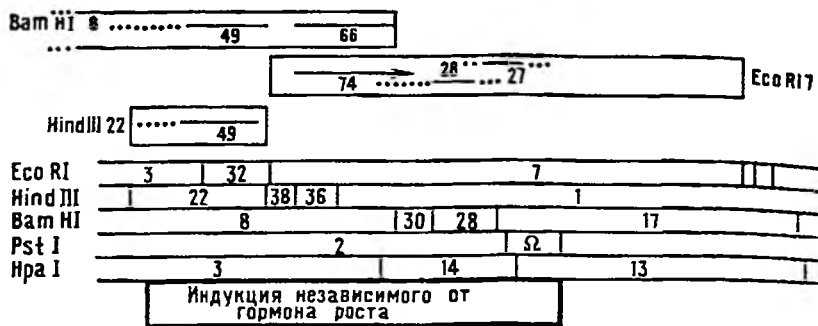


Рис. 29.4. Белок-кодирующие участки, экспрессируемые в бактериях:

прямоугольники — рестриционные фрагменты, чаще всего использованные в опытах; сплошные линии внутри них — наиболее вероятные положения кодирующих участков; пунктирные линии — пределы точности картирования; числа при сплошных линиях — размеры белков (кДа); длины сплошных линий — минимальные размеры кодирующих участков, вычисленные исходя из размера белка при средней молекулярной массе аминокислоты 120 Да.

Экспрессия в бесклеточной системе из *A. tumefaciens*

Обнаружение того, что в клетках *E. coli* T-область может направлять синтез нескольких хорошо определяемых белков без видимого участия промоторов векторной плазмиды, было несколько неожиданным. Поэтому важно было выяснить, способны ли агробактерии синтезировать те же самые белки. Это проверили с помощью бесклеточной системы сопряженной транскрипции и трансляции из *A. tumefaciens*. На рисунке 29.5 представлены результаты, полученные для ряда рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты T-области, которые направляли синтез упомянутых

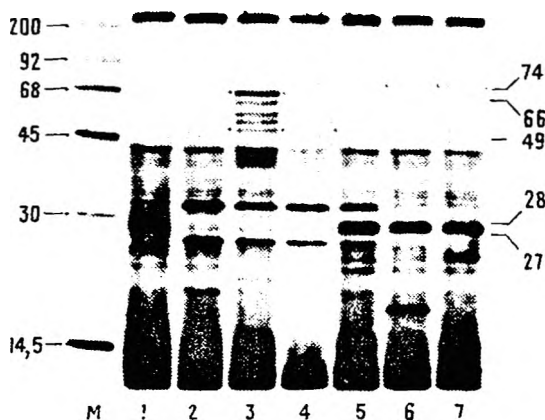


Рис. 29.5. Белки, синтез которых направляется T-областью в бесклеточной системе сопряженной транскрипции и трансляции из клеток *A. tumefaciens* (рукопись готовится к печати). Характеристики фрагментов ДНК даны в таблице 29.1 и на рисунке 29.1:

дорожки: 1 — без ДНК; 2 — pBR322; 3 — Bam HI 8 (pGV0153); 4 — Hind III 22 (pHD106.1); 5 — Hind III 1 (pGV0201); 6 — Eco RI 7 (pWK500.1); 7 — Eco RI 7 (pW K500.2); M — маркерный белки; числа справа — размеры в килодальтонах (кДа) белков, синтезированных с промоторов T-области.

белков в мини-клетках *E. coli*. В бесклеточной системе из агробактерий синтезировались белки 74 кДа, 24 кДа и 27 кДа, а белок 49 кДа в большинстве случаев обнаруживался лишь после очень длительной экспозиции. Так как последний белок очень плохо экспрессировался также и в экстракте из клеток *E. coli* (здесь не показано), можно предположить, что это отражает какую-то (пока непонятную) особенность бесклеточных систем. Любопытно, что в экстракте из агробактерий белок 74 кДа синтезировался в обеих ориентациях фрагмента *EcoRI* 7 в составе рАСУС184 (рис. 29.5, дорожки 6, 7). Напротив, в экстракте из *E. coli* он продуцировался лишь в ориентации II и его выражение строго зависело от промотора векторной плазмиды (рис. 29.2, дорожка 2). Это свидетельствует о том, что в *EcoRI* 7-фрагменте имеется промотор для синтеза белка 74 кДа, который проявляется в агробактериях, но не проявляется в *E. coli*. За возможным исключением белка 49 кДа остальные изучавшиеся белки, образующиеся в *E. coli*, способны синтезироваться и в *A. tumefaciens*, хотя совсем не обязательно, что в обеих системах используются одни и те же промоторы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение того факта, что в T-области октопиновой плазмиды Ach5 заключены гены, которые выражаются в бактериях с образованием определенных белков, дает новую информацию для понимания образования корончатых галлов. Согласно данным по генетической идентификации функций, закодированных в T-области (в данном сборнике), белки 74 кДа и 49 кДа кодируются той ее частью, которая ответственна за подавление роста побегов, а белок 27 кДа — той частью, которая контролирует подавление формирования корней в процессе морфогенеза. Труднее выявить роль белка 28 кДа, поскольку соответствующий кодирующий участок установлен не очень точно. Однако согласно генетическим данным Гарфинкеля и др. [7], в подавлении образования корней, возможно, участвует второй локус, лежащий слева от участка, кодирующего белок 27 кДа, а белок 28 кДа может представлять собой продукт трансляции этого второго локуса. Однако важно отметить, что все перечисленные функции были выявлены по выражению не в агробактериях, а в аксеничных культурах растительных тканей. Поэтому возникает вопрос, являются ли обсуждаемые белки, синтезируемые в бактериях, функциональными и принимают ли они участие в метаболизме гормонов или в его регуляции. Агробактерии действительно продуцируют цитокинины и ауксин, а Ti-плазмиды влияют на образование этих фитогормонов [3, 9, 10, 11, 15, 21]. Хотя в большинстве случаев роль Ti-плазмид не ясна, результаты недавних экспериментов показывают, что у агробактерий, по крайней мере, один локус T-области вовлечен в синтез *транс*-зеатина (Режье и др., в печати). Для выяснения возможной роли T-области в метаболизме гормонов необходимы дальнейшие исследования.

Часть Т-области, экспрессируемая в бактериях, транскрибируется также в трансформированных растительных клетках (в данном сборнике), однако соответствующие белковые продукты пока не идентифицированы. Интересно было бы выяснить, одни и те же или разные гены выражаются в бактериях и в растениях. Из данных, представленных на рисунке 29.6, видно, что три белок-кодирующих участка в бактериях коррелируют с тремя транскрипт-кодирующими участками в растениях по нескольким показателям: в пределах точности картирования совпадают их местоположения и размеры, причем в каждом случае длина транскрипта больше, чем необходимо для синтеза белка. Такое сравнение особенно поразительно для белка 74 кДа (согласно расчетам минимальный размер кодирующего его участка равен 1,85 т. п. н.): белок-кодирующий участок находится в пределах транскрипт-кодирующего участка, а кодирующая цепь в бактериях и в растениях одна и та же. На основании этого можно постулировать рабочую гипотезу о том, что в прокариотических и эукариотических клетках могут экспрессироваться одни и те же гены. Однако для подтверждения гипотезы необходимы дальнейшие исследования. На рисунке 29.6 показано также, что в бактериях синтезируется четвертый белок (28 кДа; согласно расчетам, минимальный размер его кодирующего участка равен 0,7 т. п. н.), которому, возможно, не соответствует ни один транскрипт в клетках растения. Смысл этого явления не ясен, однако речь может идти о гене, который выражается только в бактериях.

Рассматриваемая здесь часть Т-области контролирует дифференциацию, когда экспрессируется в растительных клетках. Поэтому говорят, что она вызывает ауксиноподобные и цитокининоподобные эффекты [7, 14]. Тщательный генетический анализ действия различных транскриптов Т-ДНК в растениях ([8], Иоос и

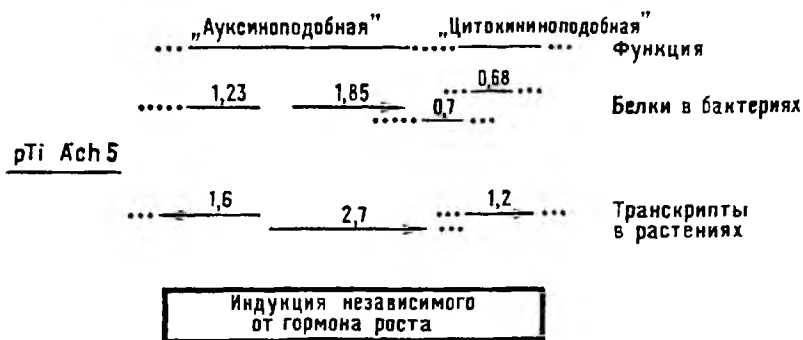


Рис. 29.6. Локализация кодирующих участков, экспрессирующихся в бактериях и растениях. Числами указаны минимальные длины кодирующих участков (см. подписи к рис. 29.5). Данные о транскриптах взяты из работы [22]; они изображены исходя из предположения, что гены не содержат интронов. На верхней линии указаны функции, идентифицированные в данной части Т-области с помощью генетического анализа [8].

др., в печати) показывает, что не менее двух генов Т-ДНК вовлечено в подавление образования побегов (ауксиноподобный эффект) и один ген — в подавление формирования корней (цитокининоподобный эффект). Поскольку та же часть Т-области, а возможно, и те же самые гены экспрессируются в агробактериях, вполне логично предположить, что бактериальные генные продукты могут осуществлять аналогичную функцию. Их роль можно представить себе следующим образом: для эффективной индукции опухоли необходимо раннее повреждение растительной ткани, которое индуцирует клеточное деление, причем полагают, что именно в это время происходит трансформация (см. обзор [2]). В неинфицированной ткани клеточные деления прекращаются после нескольких циклов, тогда как в инфицированной ткани они продолжают. Представляется возможным, что бактериальные генные продукты принимают участие в передаче гормональных эффектов от бактериальных клеток растительным, так что деление растительных клеток, индуцированное поранением, продолжается до тех пор, пока Т-область не будет перенесена в растительные клетки и не начнет там действовать. Некоторые фитопатогенные бактерии действительно оказывают гормональное воздействие на растения, причем, как было показано для *Pseudomonas savastanoi*, в это действие вовлечены гены, кодируемые плазмидой [4, 5]; однако эти гены не переносятся в растения. Вполне возможно, что на ранних этапах инфекции агробактерии используют аналогичный механизм воздействия на растение; кроме того, им удастся перенести гены в растительные клетки.

Благодарности. Данная работа представляет собой результат тесного сотрудничества с рядом исследователей, способствующих выполнению разных этапов опытов. Мы особенно хотели бы выразить нашу искреннюю благодарность И. Шеллу и группам исследователей корончатых галлов, работающих в Генте и Брюсселе (Бельгия), за то, что они предоставили нам клонированные фрагменты Т-области и, как и наши коллеги из Института им. Макса Планка в Кельне, позволили познакомиться с результатами своих исследований до их публикации. Кроме того, они помогли нам плодотворными дискуссиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred DNA of octopine crown gall. *Mol Gen Genet* 193:283—288
2. Braun AC (1978) Plant tumors. *Biochim Biophys Acta* 516:167—191
3. Claeys M, Messens E, Montagu M Van, Schell J (1978) Quantitative determination of cytokinins in culture media of *Agrobacterium tumefaciens*. *Quant Mass Spectrom Life Sci* 2:409—418
4. Comai L, Kosuge T (1980) Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 143:950—957
5. Comai L, Kosuge T (1982) Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 149:40—46

6. Comai L, Surico G, Gosuge T (1982) Relation of plasmid DNA to indoleacetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Gen Microbiol* 128:2157—2163
7. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
8. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J* 1:147—152
9. Liu ST, Kado CI (1979) Indoleacetic acid production: a plasmid function of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Biochem Biophys Res Commun* 90:171—178
10. Liu ST, Perry KL, Schardl CL, Kado (1982) *Agrobacterium* Ti-plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2812—2816
11. McCloskey JA, Hashizume T, Basile B, Ohno Y, Sonoki S (1980) Occurrence and levels of cis- and trans-zeatin ribosides in the culture medium of a virulent strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *FEBS Lett* 111:181—183
12. McPherson JC, Nester EW, Gordon MP (1980) Proteins encoded by *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid DNA (T-DNA) in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2666—2670
13. Murai N, Kemp JD (1982) Octopine synthase mRNA isolated from sunflower crown gall callus is homologous to the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:86—90
14. Ooms G, Hooykas PJ, Moleman G, Schilperoort RA (1981) Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene* 14:33—50
15. Regier DA, Morris RO (1982) Secretion of trans-zeatin by *Agrobacterium tumefaciens*: a function determined by the nopaline Ti plasmid. *Biochem Biophys Res Commun* 104:1560—1566
16. R  ther U (1980) Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. *Mol Gen Genet* 178:475—477
17. Schröder G, Schröder J (1982) Hybridization selection and translation of T-DNA encoded mRNAs from octopine tumors. *Mol Gen Genet* 185:51—55
18. Schröder J, Schröder G, Huisman H, Schilperoort RA, Schell J (1981a) The mRNA for lysopine dehydrogenase in plant tumor cells in complementary to a Ti plasmid fragment. *FEBS Lett* 129:166—168
19. Schröder J, Hillebrand A, Klipp W, Pühler A (1981b) Expression of plant tumor-specific proteins in minicells of *Escherichia coli*: A fusion protein of lysopine dehydrogenase with chloramphenicol acetyltransferase. *Nucleic Acids Res* 9:5187—5202
20. Vos G De, Beuckeleer M De, Montagu M Van, Schell J (1981) Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor-inducing plasmid pTi Ach5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 6:249—253
21. Weiler EW, Spanier K (1981) Phytohormones in the formation of crown gall tumors. *Planta* 153:326—337
22. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) The TL-DNA in octopine crown-gall tumors codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J* 1:139—146

30. ЛИПОСОМЫ В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ Ti-ПЛАЗМИД В ПРОТОПЛАСТЫ

Т. НАГАТА *

ВВЕДЕНИЕ

Нет необходимости говорить, что общей темой данного симпозиума является молекулярная генетика взаимодействий в системе бактерии — растения. В случае взаимодействия между *Agrobacterium tumefaciens* и растением бактериальная инфекция индуцирует корончатые галлы. При образовании корончатых галлов часть Ti-плазмиды, содержащейся в *A. tumefaciens*, переносится и интегрируется в ДНК растения. Для выяснения деталей этого процесса применялись многочисленные подходы, о которых говорилось на данном симпозиуме. Наш подход отличается от других. Мы пытаемся внедрить Ti-плазмиду в растительные клетки непосредственно, без бактериальной инфекции. Главная цель такого подхода — создание трансформационной системы *in vitro* с более высокой частотой трансформации. Подобная техника будет необходима для развития генной инженерии растений и для понимания образования корончатых галлов, поскольку при этом опущен сложный процесс инфекции. Ясно, что в качестве экспериментального материала для этого можно использовать лишь голые протопласты, поскольку у них отсутствуют плотные клеточные оболочки.

В этой статье мы поделимся опытом по переносу генетического материала в протопласты и индукции выражения Ti-плазмиды, обращая особое внимание на методы, разработанные нами для достижения этой цели. В настоящее время исследователи, работающие над этой проблемой, используют следующие методы: липосомный метод [3, 15], трансформация с помощью сферопластов *A. tumefaciens* [6], трансформация протопластов, культивируемых совместно с клетками *A. tumefaciens* [12], и трансформация протопластов Ti-плазмидой с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) [10]. Два из них — липосомный метод и трансформация с помощью сферопластов — были разработаны нами.

* T. Nagata, Department of Biology, School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.

ВВЕДЕНИЕ Тi-ПЛАЗМИД В ПРОТОПЛАСТЫ С ПОМОЩЬЮ ЛИПОСОМЫ

После введения Тi-плазмид в протопласты проходит довольно много времени, прежде чем удастся отобрать и идентифицировать трансформанты. Поэтому первоначально мы пытались создать систему, в которой в протопласты в качестве модельного материала вводились легко обнаружимые нуклеиновые кислоты, такие, например, как РНК вируса табачной мозаики (ВТМ). Если РНК ВТМ сохраняет свои функции внутри клеток, то их выражение легко проследить с помощью метода флуоресцирующих антител. Здесь мы рассмотрим также проблему, связанную с использованием РНК ВТМ вместо Тi-плазмид или какой-либо другой ДНК.

Хотя мы довольно успешно вводили РНК ВТМ в протопласты с помощью липосом методом Са — ЭДТА-хелатирования [4], гораздо больший успех был достигнут при использовании липосом, полученных методом выпаривания фазы (ВФ) [15]. Поэтому здесь изложены результаты, полученные именно этим методом. Поскольку вся процедура уже подробно описана [13], мы остановимся лишь на основных этапах процесса.

10 мкмоль фосфатидилсерина (ФС) и холестерина (Хол) (1:1) растворяли в 1 мл дважды дистиллированного диэтилового эфира. К полученному раствору добавляли 100 мкг РНК ВТМ, растворенной в буфере TES/his/NaCl (рН 7,4). Полученную двухфазную смесь обрабатывали ультразвуком в течение 15 с, а затем удаляли органический растворитель в роторном испарителе. Приготовленные липосомы дважды промывали с помощью ультрацентрифугирования при 20 000 об/мин в течение 20 мин. Липосомы в количестве, соответствующем 2 мкмоль фосфолипидов, добавляли к 3×10^6 протопластов. Протопласты выделяли из *Nicotiana tabacum* L. (сорт ВУ2) или *Vinca rosea* L. путем обработки при 30 °С в течение 1 ч смесью 0,1 %-ной пектолиазы Y23 и 1 %-ной целлюлазы Онозука RS, растворенной в 0,4 М D-манните; рН доводили до 5,5 с помощью 1 н. HCl. Смесью протопластов и липосом обрабатывали 12,5 %-ным ПЭГ 1540 или 10 %-ным поливиниловым спиртом (ПВС) 203 или 202 (со степенью полимеризации соответственно 300 или 200 и на 88 % гидролизованном). Препараты ПВС 202 и 203, изготовленные специально для нас фирмой Курараи Ко (Курасики, Окаяма, Япония), обладают более низкой степенью полимеризации, чем обычно, поэтому они менее вязки и более удобны для работы с протопластами. Обработку ПЭГ и ПВС проводили в течение 10 и 20 мин соответственно; затем эти полимеры удаляли промыванием средой Келлера и Мельхерса [8] с высоким рН и высоким содержанием Са. Затем протопласты культивировали в течение 24 ч, после чего с помощью окрашивания флуоресцирующим антителом против частиц ВТМ определяли долю протопластов, зараженных РНК ВТМ. Заражалось 60—90 % протопластов, и 1 нг РНК мог заразить около 300 прото-

пластов. Изучение ультраструктуры показало, что инфицированные протопласты после 24-часового культивирования заполняются частицами ВТМ. Наиболее характерной особенностью метода внесения РНК ВТМ в протопласты с помощью липосом является то, что РНК, заключенная в липосомы, обладает высокой устойчивостью к обработке РНКазой. Затем описанный метод был использован для внесения в протопласты Тi-плазмиды.

После введения в протопласты ДНК Тi-плазмиды октопинового типа вели отбор предполагаемых трансформантов на среде без регуляторов роста растений и проверяли их на способность синтезировать опиины. В настоящее время анализируется Т-ДНК таких предполагаемых трансформантов. Согласно грубым оценкам, частота подобной трансформации составляет около 10^{-6} .

Трудности, с которыми мы столкнулись при работе с Тi-плазмидой, были связаны с инкапсуляцией ее в липосомы. Долю липосом, наполненных плазмидой ДНК, определяли по методу Куроивы [11] путем окрашивания 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ), который специфически окрашивает ДНК. Оказалось, что только 1—5% липосом наполнены Тi-плазмидой (*неопубликованные данные*). Ясно, что необходимо повысить частоту инкапсуляции или попытаться рассортировывать липосомы, инкапсулирующие Тi-плазмиду.

Мы применили эту методику для инкапсуляции 2 мкг ДНК из дрожжей, несущих ген *leu 2*, и добавили такие липосомы к дрожжевым протопластам *leu⁻*, обработав их ПЭГ. В этих экспериментах частота трансформации была в 10 раз выше, чем при работе по методу Хикса-Хиннена, когда используются голые молекулы ДНК в комбинации с обработкой ПЭГ. После инкапсуляции такой ДНК в липосомы она была устойчива к расщеплению ДНКазой (А. Тоэ и Т. Нагата, *неопубликованные данные*).

Таким образом, если удастся повысить частоту инкапсуляции ДНК Тi-плазмиды, то тем самым будет достигнута более высокая частота трансформации, чем в описанных экспериментах.

ВВЕДЕНИЕ Тi-ПЛАЗМИД В ПРОТОПЛАСТЫ С ПОМОЩЬЮ СФЕРОПЛАСТОВ AGROBACTERIUM

Параллельно с использованием липосом мы пытались также вводить сферопласты *A. tumefaciens* в растительные протопласты. Сферопласты готовили обработкой лизоцимом в сочетании с предварительной обработкой карбенициллином. Поглощение бактериальных сферопластов растительными протопластами вызывали обработкой ПЭГ или ПВС в комбинации с промывкой при высоком рН и высоком содержании Са. После обработки протопластов *V. rosea* сферопластами последние убивали тепловым воздействием (40 °С в течение 4 дней). Клетки *V. rosea* устойчивы к такому тепловому воздействию, тогда как клетки других растений, включая табак, неустойчивы. Поэтому при работе с другими расти-

тельными протопластами для удаления бактерий. использовали обработку антибиотиком [6].

По данным электронно-микроскопических исследований, каждый протопласт поглощает около 10 сферопластов. Обработанные протопласты культивировали в среде без регуляторов роста растений, после отбора полученное потомство обследовали по генетическим признакам Ti-плазмиды. До 10^{-4} — 10^{-3} таких протопластов были трансформантами, обладавшими способностью синтезировать опин. Однако после длительного культивирования некоторые из таких клонов утрачивали эту способность. Преимущество данного метода состоит в том, что его можно применять к различным типам бактериальных штаммов без выделения Ti-плазмид. В этой связи было бы интересно применить метод к авирулентным штаммам *A. tumefaciens*, несущим Ti-плазмиду, у которых в результате транспозонного мутагенеза выключен локус онкогенности вне Т-ДНК. Такой эксперимент позволит выяснить роль этого участка онкогенности Ti-плазмиды (работа в этом направлении ведется).

ДРУГИЕ ПОДХОДЫ

Хотя нами накоплен некоторый опыт по трансформации протопластов путем совместного культивирования регенерирующих протопластов с клетками *A. tumefaciens* и путем микроинъекции, прямое сравнение между этими методами еще не проводилось. Поскольку каждый из них обладает некоторыми преимуществами, представляется необходимым сопоставить их в деталях.

В случае микроинъекции мы столкнулись с затруднением при фиксации растительных протопластов. Даже если протопласты погружены в плотную агаровую среду, при инъекции стеклянной иглой они сдвигаются. Это может быть обусловлено тем, что растительные протопласты были суспендированы в условиях повышенного осмотического давления, что привело к значительному увеличению их поверхностного натяжения. Поскольку микроинъекция дает возможность вводить ДНК в ядро, экспериментальный подход необходимо усовершенствовать. Возможно, что для растительных протопластов окажется пригодным также метод укалывания, разрабатываемый Ямамото и др. [18]. Если удастся преодолеть указанную трудность, микроинъекция может стать весьма эффективным методом трансформации, поскольку микроинъекция в ядро значительно повысит частоту трансформации [2].

ПОГЛОЩЕНИЕ ЛИПОСОМ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ СФЕРОПЛАСТОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПРОТОПЛАСТАМИ

Как указывалось выше, для внесения липосом или агробактериальных сферопластов в протопласты необходима их обработка ПЭГ или ПВС в сочетании с высоким рН и высокими концентра-

диями кальция. В этой связи следует напомнить, что именно такие условия исходно применялись для слияния протопластов. Поэтому в самом начале работы мы предположили, что такие обработки могут обеспечить слияние протопластов с липосомами или бактериальными сферопластами. Однако, как показывают электронно-микроскопические наблюдения, липосомы и бактериальные сферопласты не сливаются с мембранами протопластов, а поглощаются протопластами с помощью процесса эндоцитоза. Впоследствии материал, заключенный в липосомах или сферопластах, освобождается в цитоплазму протопластов. Этот вывод противоречит мнению нескольких авторов, работающих по данной теме, которые, однако, не проводили ультраструктурных исследований [17]. Они полагают, что этот процесс представляет собой слияние. Поэтому я хотел бы подчеркнуть, что здесь происходит именно эндоцитоз, а не слияние между протопластными мембранами и липосомами или бактериальными сферопластами [5, 7].

ЗНАЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЕЦИПИЕНТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ

Во всех экспериментах, результаты которых опубликованы к настоящему времени, трансформация осуществлялась на несинхронизированных в отношении клеточного цикла популяциях. Однако, как известно, в опытах по трансформации определенную роль играет и физиологическое состояние реципиентных клеток, поэтому нужны систематические исследования в этом направлении. Судя по данным давних опытов Брауна [1], наиболее интенсивно растущие корончатые галлы были получены в период синтеза ДНК, индуцированного поранением ткани. Поэтому важно провести трансформацию протопластов в S-фазе, если их удастся выделить. С другой стороны, могут представлять интерес протопласты в M-фазе, поскольку клетки в этой фазе не имеют ядерной мембраны и могут оказаться более восприимчивыми к внедрению в геном генетического материала.

Условием получения протопластов в специфической фазе клеточного цикла является синхронизация роста клеток. Этой проблеме посвящено много работ, однако до сих пор наиболее высокий зарегистрированный митотический индекс составлял всего 35 % (см. обзор [9]). Совсем недавно нам удалось выполнить указанное условие, воспользовавшись афидиколином — специфическим ингибитором эукариотической ДНК-полимеразы α .

Высокая степень синхронизации была достигнута путем обработки клеток табака сорта ВУ2 в жидкой культуре афидиколином (5 мкг/мл) в течение 24 ч с последующим удалением его из среды промыванием. Через 9 ч после удаления афидиколина митотический индекс составлял 70 %. Причем синтез ДНК начался сразу же после удаления афидиколина и закончился 4 ч спустя. Как было установлено с помощью радиоавтографии и флуоресцентной микроскопии с применением иодистого пропидия (*неопубликован-*

ные данные), за это время более 90 % клеток завершили синтез ДНК.

Более того, путем обработки комбинацией ферментов пекто-лазы Y23 и целлюлазы Онозука RS нам удалось получить протопласты на разных стадиях клеточного цикла. Протопласты были получены через 2 и 9 ч после обработки афидиколином, что соответствует S- и M-фазе клеточного цикла. Протопласты из клеток в S- и M-фазе были инфицированы молекулами РНК ВТМ, инкапсулированными в липосомы; в обоих случаях достигнута достаточно высокая степень инфекции [16].

Поскольку, как отмечалось выше, протопласты из синхронизированных таким путем клеток могут обладать высокой восприимчивостью к трансформации, нами предпринимаются попытки внести в такие протопласты из клеток в S- и M-фазе Ti-плазмиду. С другой стороны, эти синхронизированные клетки будут также полезны для трансформации путем совместного культивирования со сферопластами и с клетками *A. tumefaciens*. Протопласты клеток в S-фазе также могут оказаться пригодными для микроинъекций с целью достижения высокого уровня трансформации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы трансформации протопластов с помощью липосом и сферопластов *A. tumefaciens*, равно как микроинъекции и совместное культивирование с бактериями, после дальнейшего их усовершенствования, вероятно, станут полезным инструментом для генной инженерии растительных клеток. Повышение восприимчивости к трансформации путем использования протопластов из синхронизированных по клеточному циклу клеток также будет играть важную роль в подобных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Braun AC, Stonier T (1958) Morphology and physiology of plant tumors. *Protoplasma* 5a:1—93
2. Capecchi MR (1980) High efficiency transformation by direct microinjection into cultured mammalian cells. *Cell* 22:479—488
3. Fraley RT, Dellaporta SL, Papahadjopoulos D (1982) Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts: A sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1859—1863
4. Fukunaga Y, Nagata T, Takebe I (1981) Liposome-mediated infection of plant protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 113:752—760
5. Fukunaga Y, Nagata T, Takebe I, Kakehi T, Matsui C (1983) An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. *Exptl Cell Res* 144:181—189
6. Hasezawa S, Nagata T, Syono K (1981) Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Mol Gen Genet* 182:206—210
7. Hasezawa S, Matsui C, Nagata T, Syono K (1983) Cytological study of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. *Can J Bot* 61:1052—1057
8. Keller WA, Melchers G (1973) The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z Naturforsch* 28c:737—741

9. Komamine A, Morigaki T, Fujimura T (1978) Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell culture. In: Thorpe TA (ed) *Frontiers of plant tissue culture 1978*. University of Calgary Press, Calgary, Alberta, Canada, pp 159—168
10. Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* 296:72—74
11. Kuroiwa T (1982) Mitochondrial nuclei. *Int Rev Cytol* 75:1—60
12. Marton L, Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort RA (1979) In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277:129—131
13. Nagata T (1983a) Entrapment of genetic materials into liposomes and their delivery to plant protoplasts. In: Gregoriadis G (ed) *Liposome technology*. CRC Press, New York (in press)
14. Nagata T (1983b) Interaction of liposomes and protoplasts as a model system of protoplast fusion. In: Beers RF Jr, Bassett EG (eds) *Cell fusion*. Raven Press, New York (in press)
15. Nagata T, Okada K, Takebe I, Matsui C (1981) Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol Gen Genet* 184:161—165
16. Nagata T, Okada K, Takebe I (1982) Mitotic protoplasts and their infection with tobacco mosaic virus RNA encapsulated in liposomes. *Plant Cell Rep* 1:250—252
17. Schaffner W (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2163—2167
18. Yamamoto F, Furusawa M, Takamatsu K, Muiura N, Uchida T (1981) Intracellular introduction of a fixed quantity of substances by pricking cells using a modified microscope. *Exptl Cell Res* 135:341—345

31. ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ КЛЕТКАМИ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS И ДНК ЕЕ Т1-ПЛАЗМИДЫ

Г. ВУЛЛЕМС, Ф. КРЕНС и Р. СХИЛЬПЕРОРТ *

ВВЕДЕНИЕ

Успехи молекулярной генетики и биологии позволяют осуществлять генетические манипуляции не только с микроорганизмами и с культурами животных клеток, но и с растениями и растительными клетками в культуре. Последнее стало возможным главным образом благодаря новейшим достижениям в понимании болезни растений корончатые галлы, которая вызывается почвенной бактерией *A. tumefaciens*. Кроме того, важное значение для экспериментов по генетической инженерии растений имеет способность растительных тканей регенерировать целые растения из одной-единственной клетки. Регенерация растений из одиночных клеток, однако, до сих пор ограничена сравнительно небольшим числом родов и еще не достигнута, например, для однодольных растений, к которым относятся зерновые культуры.

Генетические манипуляции осуществляются с помощью разнообразных приемов. Слиянием соматических клеток можно смешивать более-менее целые геномы, а отдельные гены можно интегрировать в геном трансформацией растительных протопластов под действием выделенной ДНК. Техника рекомбинантных ДНК может быть полезной для соединения нужных последовательностей с целью внедрения их в геном хозяина.

Помимо непосредственного применения таких методик в селекции растений, они дают возможность изучать организацию генома и регуляцию выражения генов у высших растений.

Методы трансформации растительных клеток основаны на применении природных или сконструированных ДНК-содержащих векторов, способных интегрировать в геном хозяина либо обладающих автономной репликацией. Подобные векторы растительной ДНК должны содержать: сайты для стабильного встраивания генов, пригодные для отбора маркеры, последовательности ДНК,

* G. J. Wullems, F. A. Krens, and B. A. Schilperoort, Department of Biochemistry, State University of Leiden, Wassenaarseweg 64, 2333 AL., Leiden, The Netherlands.

обеспечивающие репликацию или встраивание в геном растения. Последнее свойство необходимо для стабильного поддержания и передачи интегрированных генов потомству. Необходимы, очевидно, и все типы регуляторных последовательностей для выражения генов в растительных клетках. Самым перспективным вектором растительной ДНК в настоящее время является Ti-плазмида клеток *A. tumefaciens*. Эта плазмида индуцирует у двудольных растений опухоли, так называемые корончатые галлы. Однодольные растения устойчивы к этому заболеванию. Индукция опухоли обусловлена включением в растительный геном специфического участка Ti-плазмиды, называемого T-ДНК. Эта T-ДНК интегрирует в ядерную ДНК и экспрессируется в мРНК и белок.

СИСТЕМА КОРОНЧАТОГО ГАЛЛА

Фитопатогенная *A. tumefaciens*, относящаяся к семейству Rhizobiaceae, как и *A. rhizogenes*, которая вызывает болезнь бородачатые корни, для индукции опухоли нуждается в поранении растения. Это необходимо для возникновения клеток, находящихся в особом состоянии. Для бактерий, по-видимому, необходима некая подготовительная фаза, прежде чем они обретут способность индуцировать опухоль. Чтобы трансформировать растительные клетки, бактерии должны прикрепиться к клеточной стенке. Прикрепление предположительно определяется липополисахаридным (ЛПС) компонентом бактериальной клеточной стенки и фракцией полигалактуроновой кислоты растительных клеточных стенок. Невосприимчивость однодольных растений к индукции опухолей, вероятно, связана с отсутствием на клеточных стенках этих растений участков для прикрепления бактерий. До сих пор почти ничего не известно о молекулярных процессах, обеспечивающих перенос ДНК из вирулентных агробактерий в клетки растений. Однако результаты опытов с растениями и растительными клетками показывают, что этот процесс завершается в течение 32 ч, после чего гибель бактерий уже не сказывается на развитии опухоли.

Агентами, ответственными за индукцию опухоли, являются плазмиды, называемые индуцирующими опухоли, или Ti-плазмидами. Описано три класса Ti-плазмид: октопиновые, нопалиновые и агропиновые. Помимо опухолеобразования, ДНК Ti-плазмиды кодирует также синтез в опухолевой ткани опухолеспецифичных производных аминокислот, называемых опинами (примеры — октопин, нопалин, агропин). Октопин и нопалин синтезируются закодированными в плазмиде ферментами лизопиндегидрогеназой (ЛпДГ) и нопалиндегидрогеназой (НпДГ) соответственно. Ti-Плазмиды кодируют также катаболические ферменты, превращающие эти соединения в продукты, которые могут служить для бактерии источниками углерода и азота. Следовательно, взаимодействие между бактерией и растительными клетками, приводящее к образованию опухоли, полезно для бактерии.

Основные особенности корончатых галлов — фитогормон-независимый рост (гормональная автотрофия) ткани корончатого галла при введении ее в культуру и содержание опинов в клетках опухоли. Эти свойства можно считать фенотипическими признаками трансформированных опухолевых клеток. Сущность трансформации состоит в интеграции сегмента Ti-плазмиды в геном растительных клеток [2]. Этот сегмент называют T-областью в бактерии и T-ДНК в растении. Нопалиновые опухоли табака могут нести от одной до четырех разных копий T-ДНК, каждая из которых имеет молекулярную массу около 1 600 000. Эти копии могут располагаться тандемно головой к хвосту [20]. T-ДНК в октопиновых опухолях может состоять из одного сегмента Ti-плазмиды, TL-ДНК, или двух ее сегментов, TL-ДНК и TR-ДНК [14]. В большинстве каллусных тканей табака присутствует TL-ДНК, но иногда встречается и TR-ДНК. Изучение делеционных мутаций октопиновой Ti-плазмиды показало, что делеция TR-области не влияет на онкогенность, в то время как делеция TL-области приводит к потере онкогенности [10]. Это означает, что лишь TL-ДНК содержит гены, ответственные за развитие опухоли. Значительная часть TL-ДНК содержит последовательности, общие с нопалиновой T-ДНК [3], а это показывает, что они обладают несколькими общими генными функциями, вероятно, существенными для формирования и поддержания опухоли [15]. Результаты опытов по экспрессии октопиновой T-ДНК показали, что всего с T-ДНК считывается семь транскриптов [5, 15]. То, что транскрипция T-ДНК дает функциональные макромолекулы мРНК, показано в опытах по трансляции *in vitro*, в которых было идентифицировано три белка. Один из них охарактеризован как ЛпДГ [13]. В связи с этим можно сделать вывод, что прокариотическая T-область, видимо, содержит все необходимые сигналы для функционирования в растительных клетках.

Поскольку T-ДНК может иметь значение для фитогормон-независимого роста клеток корончатого галла, важно установить, коррелируют ли функции генов T-ДНК с ауксиновой и цитокининовой активностями. Для этого были подвергнуты изучению мутанты по октопиновой Ti-плазмиде [11]. Ряд из них как будто индуцировал опухоли с aberrантной морфологией. Два мутанта (LBA1501 и LBA4060) индуцировали на табаке опухоли, которые стимулировали активное образование побегов, тогда как мутант LBA4210 дал начало опухолям, способствовавшим чрезмерному образованию корней. Результаты этих опытов показали, что в отличие от ситуации, наблюдаемой в случае нормальных опухолей, индуцируемых штаммами дикого типа, в мутантных опухолях активны ростовые факторы, стимулирующие формирование либо побегов, либо корней. Можно считать, что регенерация побегов обусловлена цитокининоподобной активностью, а формирование корней — ауксиноподобной. Инокуляция растений смесью мутантов двух типов (LBA4060 + LBA4210) приводила к формированию опухолей, которые были идентичны опухолям, индуцируемым

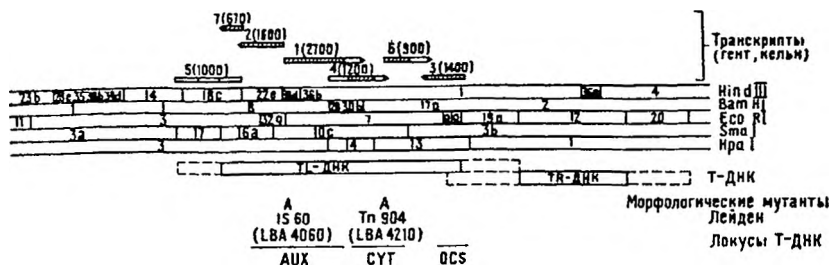


Рис. 31.1. Рестрикционная карта части октопиновой плазмиды pTiAch5 [1]. Показано положение на карте Т-ДНК и транскриптов с Т-ДНК. Протяженность TL- и TR-ДНК указана по данным Томашоу и др. [14], а расположение транскриптов — по данным Вильмитцера и др. [15]. Внизу указаны положения мутаций в Ti-плазмиде, ведущих к «побегообразующему» (LBA4060) или «корнеобразующему» (LBA4210) фенотипу опухолей. Изображены также соответствующие локусы Т-ДНК.

штаммами дикого типа. На основании этих данных и результатов анализа Т-ДНК мутантных опухолей мы заключили, что в TL-ДНК содержатся локусы, определяющие ауксино- и цитокининоподобный фенотип (рис. 31.1). Инактивация «ауксинового» локуса (у мутантов LBA1501 и LBA4060) вызывает цитокининоподобный эффект, поскольку эта активность, детерминированная Т-ДНК, больше не уравновешивается ауксиновой активностью, что приводит к росту побегов. С другой стороны, инактивация «цитокининового» локуса (у мутанта LBA4210) ведет к формированию на опухоли корней. Недавно было выделено большое число мутантов по Т-области октопиновой Ti-плазмиды, что дало возможность более точно картировать рассматриваемые локусы, названные авторами *tms* (морфология опухоли побегообразующего типа, *tumour morphology shooting*) и *tmr* (морфология опухоли корнеобразующего типа, *tumour morphology rooting*). Дополнительно был идентифицирован новый локус, названный *tml* (морфология крупной опухоли, *tumour morphology large*) [4, 7]. Вставка в этом локусе дала начало опухолям, которые значительно превосходили по размеру опухоли, индуцируемые штаммом дикого типа (рис. 31.1).

Мутации в Т-ДНК, описанные выше, можно также объяснить присутствием или отсутствием транскриптов с Т-ДНК. «Побегообразующий» фенотип реализуется, когда мутацией затронуты транскрипты № 1 и (или) № 2, а корнеобразующий фенотип — когда в опухоли отсутствует транскрипт № 4 [7]. Размер опухоли может определяться транскриптом № 6 [4]. Опыты с мутантными плазмидами показали, что можно мутагенизировать Ti-плазмиду таким образом, что будут инактивированы онкогены, предположительно локализованные в «ауксиновом» и «цитокининовом» локусах.

Трансформация растения (клеток) такими дефектными плаз-

мидами может привести к образованию трансформированных тканей, сохраняющих морфогенный потенциал, что позволяет им регенерировать целые растения.

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Трансформированные клетки корончатого галла обладают такими свойствами, в частности гормон-независимым ростом, которые позволяют вести отбор трансформированных клеток, содержащихся в популяции нормальных клеток. С развитием методов выделения единичных растительных клеток в виде протопластов, свободных от клеточных оболочек, и методов культивирования таких протопластов, дающих затем каллусную ткань, из которой возможна регенерация растений для последующей селекции, разработаны разнообразные приемы с целью трансформации единичных клеток с использованием систем корончатых галлов. Фитогормональная автотрофия растительных клеток в этой системе может восполнить существующий и поныне дефицит других пригодных для отбора стабильных ауксотрофов у высших растений. С другой стороны, для применения систем трансформации могут быть пригодны уже описанные мутантные растительные ткани, такие, как хлорофилл-недостаточные, устойчивые к антибиотикам и дефектные по метаболизму.

Метод совместного культивирования

Этот подход к трансформации изолированных растительных клеток основан на естественном процессе инфекции, при котором *A. tumefaciens* вводит ДНК Ti-плазмиды в геном растения. Предполагается, что необходимым условием для прикрепления бактерий и инфекции протопластов, без которых невозможна их трансформация, является регенерация новой клеточной стенки [8, 17]. Для протопластов табака, большинство которых делится через 3—5 дней после выделения, восприимчивая стадия наступает на третий день. Совместное культивирование протопластов в таком возрасте с клетками *A. tumefaciens* в присутствии фитогормонов приводит к сильному слипанию клеток. Вероятно, это вызвано сорбцией бактерий на вновь сформированные клеточные стенки протопластов. Время совместного культивирования, необходимое для максимальной трансформации, составляет около 32 ч. После этого бактерии могут быть убиты добавлением антибиотиков, протопласты же необходимо культивировать 4—6 нед в присутствии гормонов, чтобы они образовали небольшие колонии. Еще через 4—6 нед их высевают на плотную среду без фитогормонов. Продолжительное селективное давление позволяет выжить лишь трансформированным клеткам. Этим методом получены линии трансформированных тканей табака путем совместного культивирования с октопиновыми и нопалиновыми агробактериями, а также с агробактериями, несущими коинтегра́т между октопиновой и нопалиновой плазмидами [17]. Частота, с которой образуются

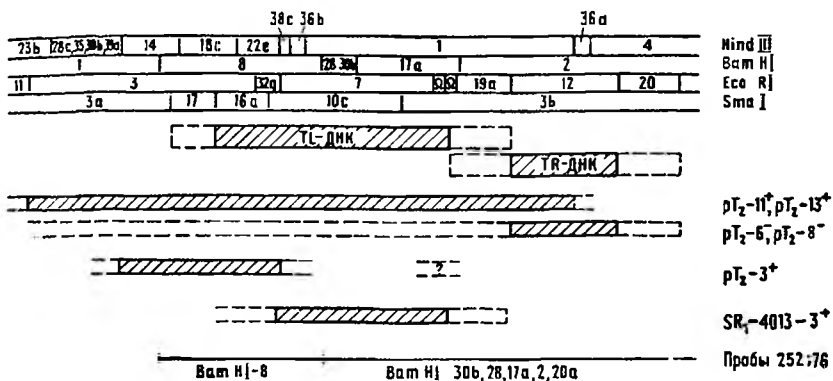


Рис. 31.2. Организация Т-ДНК в некоторых октопиновых опухолевых тканях, полученных методом совместного культивирования (SR1-4013-3), соматической гибридизации (B+S-42-3) и трансформации под действием ДНК (pT2-1b1-11 и pT2-1b1-6). SR1-4013-3 и B+S-42-3 представляют примеры «побегообразующих» опухолевых тканей с делецией левой части ТЛ-ДНК; pTi-ДНК-трансформанты pT2-1b1-11 и 6 представляют примеры крайностей по протяженности участков Т-ДНК, интегрируемых при трансформации посредством ДНК. Наличие или отсутствие октопина указано знаком + или -. Протяженность ТЛ- и TR-ДНК указана по данным [14].

такие трансформанты, варьирует от 0,1 до 1 % от исходного числа протопластов. Различие между опухолевыми тканями, полученными при совместном культивировании или в результате инфекции стебля растения, состоит в том, что в первом случае она содержит однородную популяцию трансформированных клеток, а во втором — представляет собой смесь трансформированных и нормальных клеток. Еще одно различие между методом совместного культивирования и индукцией опухолей *in vivo* состоит в том, что в первом случае в одном опыте можно выделить большое число независимых трансформантов, в которых наблюдается расщепление опухолевых маркеров. Некоторые из них могут быть октопинположительными, а другие — октопинотрицательными. К тому же ряд из них обнаруживает высокую способность к образованию побегов, даже если эксперимент выполнен с октопиновым штаммом дикого типа. Такой штамм не дает регенерирующих опухолей в случае инфекции на стебле растения.

Трансформанты, полученные методом совместного культивирования, содержат Т-ДНК довольно определенного размера. В целом организация Т-ДНК в таких тканях несущественно отличается от организации Т-ДНК корончатых галлов, индуцированных на растении [11] (рис. 31.2).

Метод трансформации под действием чистой ДНК

Метод трансформации растительных протопластов изолированной ДНК Ti-плазмид основан на приеме, который использовался в нашей лаборатории для соматического слияния протопластов

31.1. Свойства трансформантов, полученных после трансформации протопластов табака *in vitro* под действием рТi-ДНК

Линия трансформантов	Активность ЛпДГ	Гормональная автотрофии	Регенерация	Т-ДНК
рТ2-1b1-2	—	+	+	+
3	+	—	—	+
6	—	+	+	+
8	—	+	+	+
9	+	+	—	+
10	+	+	—	+
11	+	+	—	+
13	+	+	—	+
14	+	+	—	+
15	+	+	—	+
20	—	—	+	+
21	—	—	+	+

табака [6, 16]. Эта процедура включает инкубацию свежеизолированных протопластов с ДНК Тi-плазмиды в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) и ДНК спермы сельди в качестве носителя. После инкубации ПЭГ постепенно разводился добавлением послепоследней инкубационной смеси с высоким содержанием Са⁺⁺ и рН 7. После обработки протопласты культивировали в среде в присутствии фитогормонов. Когда колонии в достаточной мере подрастали, их переносили на среду без гормонов для отбора трансформированных клеток. Этим приемом удавалось выделить трансформанты с частотой 10⁻⁴—10⁻³ от исходного числа протопластов. Анализ трансформантов по маркерам гормональной автотрофии опухолей и синтезу октопина показал, что, как и в опытах по совместному культивированию, между независимыми трансформантами происходило расщепление по указанным маркерам. Из 12 трансформантов у 6 линий проявились оба свойства: 5 линий были гормон-независимыми, но не синтезировали октопин, а один трансформант был гормон-зависимым и октопин-негативным (табл. 31.1). Эти тканевые линии были проанализированы на наличие Т-ДНК. Блоттинг-гибридизация по Саузерну показала наличие в каждой линии последовательностей ДНК, происходящих от Тi-плазмиды. Наиболее заметным отличием этих линий по организации Т-ДНК от опухолевых линий, индуцированных бактериальной инфекцией, было значительное варьирование структуры Т-ДНК у разных рТi-ДНК-трансформантов (рис. 31.2). Некоторые трансформанты несут фрагмент Т-ДНК, у которого левый и правый концы длиннее, чем у «основной» ТL-ДНК, содержащейся в корончатых галлах. В других трансформантах содержится как ТL-ДНК, так и TR-ДНК, причем число копий TR-ДНК больше, чем ТL-ДНК. Тот факт, что встречаются Т-ДНК различных размеров, иногда больших, чем фиксированная «основная» Т-ДНК, находящаяся в опухолях, индуцируемых бактериями, свидетельствует о том, что интеграцию в геном растения специфического фрагмента Тi-плазмиды фикси-

рованного размера обеспечивает какой-то специальный механизм, определяемый бактерией. Этот механизм не действует при трансформации протопластов изолированной рТi-ДНК. Обнаружение в некоторых трансформантах более двух граничных фрагментов и отсутствие внутренних фрагментов Т-ДНК в других свидетельствуют о бóльшей неупорядоченности и перестройках Т-ДНК в случае рТi-ДНК-трансформации протопластов, чем после бактериальной трансформации *in vivo*. Неизвестно, вызвано ли это разрушением плазмидной ДНК перед ее интеграцией в хромосому растения или отсутствием специфического механизма интеграции, зависящего от бактерии. Результаты трансформационных экспериментов *in vitro* ясно показывают, что ДНК Тi-плазмиды способна сама по себе трансформировать растительные клетки. Это обстоятельство открывает возможность создания методов трансформации клеток однодольных растений, так как при описанном методе трансформации с помощью ДНК не требуется специфического прикрепления агробактерий к растительным клеткам, которое происходит только в случае двудольных растений.

СУДЬБА Т-ДНК В РЕГЕНЕРИРОВАННЫХ РАСТЕНИЯХ

В ходе разработки в нашей лаборатории систем трансформации единичных клеток мы обнаружили, что опухолевые ткани, полученные путем трансформации, проявляют повышенную способность к образованию побегов. Хотя такая способность характерна для опухолей нопалинового типа, опухоли октопинового типа, индуцируемые бактериальными штаммами при заражении стеблей растений, полностью утрачивают свой морфогенный потенциал. Однако при использовании октопиновых бактерий дикого типа в опытах по совместному культивированию трансформантов способность к регенерации побегов часто восстанавливается [17]. Побег нопалиновых и октопиновых трансформантов были отделены от каллусных тканей и выращивались отдельно. У всех побегов корни не отрастали, в них синтезировались опины; при обратном введении в тканевую культуру (табл. 31.2) они были фитогормон-независимыми. Поскольку корни у побегов отсутствовали, их прививали на верхушки здоровых стеблей табака, на которых они развились в зрелые цветущие растения, сохранив при этом способность к синтезу опинов. Цветки таких растений отличались значительным удлинением пестиков (гетеростилия) и проявляли мужскую стерильность [18]. На таких растениях можно было получить семена перекрестным опылением пыльцой с контрольных растений табака. Полученные семена высели на культуральную среду и получили два типа проростков: 56 % проростков, происходящих от трансформантов нопалинового типа, морфологически выглядели нормальными, тогда как 44 % обнаружили трансформированный фенотип. Развитие таких сеянцев было сходным с развитием родительских трансформантов. Различные ткани нопалинового типа и проростки были проанализированы на наличие

Корни не образуются
Тератомоподобная морфология
Опинположительность
Мужская стерильность
Невосприимчивость к повторной инфекции агробактериями
Устойчивость к растительным РНК-содержащим вирусам*

* См. дополнение при корректуре. — *Прим. ред.*

Т-ДНК [9]. На основании результатов этих опытов можно было заключить, что суммарная Т-ДНК, содержащаяся в исходной каллусной ткани трансформантов, в ходе регенерации и роста растений сохранялась неизменной и целиком передавалась потомству. Что касается стабильности Т-ДНК, то по этому признаку трансформанты отличались от опухолевых побегов, описанных другими авторами. Родительские растения и сеянцы, выращенные из линии опухоловой ткани ВТ37 Янгом и Симпсоном [19], утратили все признаки опухоли и содержали только концевые фрагменты Т-ДНК. Сеянцы, описанные Оттенем и др. [12], ведущие свое происхождение из октопиновой опухоли, сохранили способность к синтезу октопина, но утратили все остальные признаки опухоли. В этих сеянцах Т-ДНК обнаружена не была. В обоих случаях сеянцы отбирались по способности формировать корни. Отличия упомянутых выше регенерантов и сеянцев, описанных Янгом и Симпсоном, а также Оттенем и др., от наших сеянцев можно предположительно объяснить присутствием транскриптов, кодируемых участками Т-ДНК.

Было постулировано, что нопалиновая Т-ДНК кодирует ряд транскриптов, вовлеченных в морфогенез опухоловой ткани. Предполагается, что транскрипт № 4 подавляет формирование корней, а транскрипты № 1 и 2 — рост побегов [7].

Поскольку в первых двух случаях отбор регенерантов произведен на основе полного восстановления морфогенетической способности, корнеобразование при этом могло протекать только в отсутствие транскрипта № 4. Это означает, что в отсутствие транскриптов № 1 и 2, подавляющих образование побегов, у таких растений должна отсутствовать большая часть Т-ДНК (рис. 31.3). В нашем случае регенеранты и сеянцы выращивались на культуральной среде, обеспечивающей рост без корневой системы. Поэтому могли выжить и регенеранты, сохранившие участок Т-ДНК, который кодирует транскрипт, подавляющий корнеобразование. Это согласуется с анализом Т-ДНК таких растений, которые содержат правую половину Т-ДНК, обычно присутствующую в нопалиновых опухолях. Прохождение через мейоз не меняет размер этой Т-ДНК (рис. 31.3). То, что растениям-потомкам передается большой фрагмент Т-ДНК, открывает возможность внедрения желаемых генов в растение путем использования Ti-плазмиды в качестве вектора. Так как локусы Т-ДНК, контролирующие морфо-

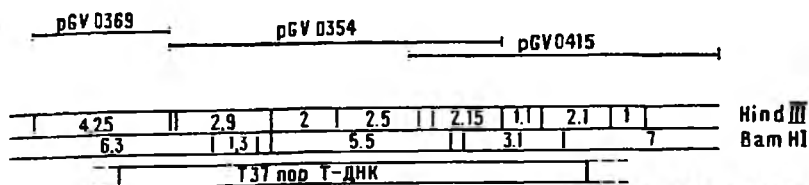
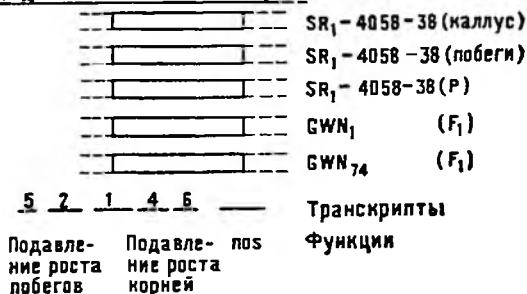


Рис. 31.3. Организация Т-ДНК в разных тканях опалинового трансформата SR1-4058-38. Рестрикционная карта части опалиновой плазмиды рTi-T37 и протяженность Т-ДНК в корончатом галле Т37 по данным Янга и Симпсона [19]. SR1-4058-38 ведет происхождение от совмест-



но культивировавшихся протопластов табака со штаммом *A. tumefaciens* LBA4058, содержащим плазмиду рTi-T37. Проанализирована ДНК, выделенная из каллусной ткани, побегов, зрелых регенератов-привоев и растений-потомков. Растения-потомки GWN1 и GWN74 получены в половых скрещиваниях между SR1-4058-38 и нормальной линией табака SR1. Все опухольные ткани продуцировали опалини. Положение соответствующих транскриптов, гомологичных участкам октопиновых опухолей, дано по Вильмитцеру и др. [15].

генез, известны, мутации в этих локусах на Ti-плазмиде с последующей трансформацией могли бы привести к полному восстановлению морфогенетического потенциала трансформированных тканей с сохранением (мутагенизированной) Т-ДНК в регенерантах и растениях-потомках. Использование Ti-плазмиды было бы менее ценным, если бы чужеродная ДНК утрачивалась в ходе мейоза растительных клеток. И в этом отношении Ti-плазмида отвечает всем требованиям, поэтому она является хорошим кандидатом для применения в генетической инженерии растений.

УСТОЙЧИВОСТЬ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ К ЗАРАЖЕНИЮ

Если трансформированным растениям нанести раневые повреждения и инфицировать их вирулентными агробактериями, образования опухоли не происходит. Трансформированные растения невосприимчивы к *A. tumefaciens*. Заражение трансформированных растений клетками *A. rhizogenes*, индуцирующими на здоровых растениях бородастые корни, приводит к выраженному опухолевому разбуханию стебля в месте инфекции. Это явление можно объяснить ауксиновой и цитокининовой активностями. Отсутствие у трансформированных растений корней, утолщение стебля и пониженное апикальное доминирование могут быть результатом относительно высокой цитокининовой активности. Это может быть также причиной того, что *A. tumefaciens* не индуцирует опухоли на

таких растениях. Образование опухолей на здоровых растениях может быть подавлено экзогенным кинетином. Наблюдаемое набухание стебля после инфекции клетками *A. rhizogenes* может быть ответной реакцией на некий ростовой фактор, обладающий выраженной ауксиноподобной активностью, который выделяется инфицирующими клетками. Эта активность наряду с предполагаемой высокой цитокининовой активностью в трансформированных растениях табака может также побуждать к делению клетки, находящиеся на периферии места поранения. Выдвигаемая теория эффекта высокого содержания цитокинина может также иметь значение и в отношении устойчивости растений к другим микроорганизмам. Некоторые химические соединения, включая цитокинины, индуцируют у определенных сортов табака синтез растворимых белков, называемых белками патогенеза (БП). Такие белки индуцируются также РНК-содержащими вирусами и другими патогенами при заражении растений. Функция этих белков еще неизвестна, но, вероятно, они играют роль в повышении устойчивости растительных клеток к патогенам. Для проверки этой гипотезы мы инфицировали контрольные и Т-ДНК-содержащие растения различными РНК-содержащими вирусами. Предварительные результаты таких опытов показывают, что в отличие от контрольных растений у трансформированных растений не наблюдаются специфичные для этих вирусов симптомы заражения. Эти результаты сейчас изучаются более тщательно, чтобы установить молекулярную основу подобной устойчивости к вирусной инфекции. Если гены Т-ДНК участвуют в защите растений против вирусных патогенов, то Ti-плазмиды представляют собой уникальную систему, придающую растениям устойчивость к вирусной инфекции.

Дополнение при корректуре. Повторные опыты по заражению трансформированных растений РНК-содержащими вирусами не выявили заметных отличий в реакции контрольных и трансформированных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred DNA of octopine crown galls. *Mol Gen Genet* 183:283—288
2. Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263—271
3. Engler G, Depicker A, Maenhaut R, Villarroel R, Montagu M Van, Schell J (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between octopine and nopaline Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol* 152:183—208
4. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
5. Gelvin SB, Thomashow MF, McPherson IC, Gordon MP, Nester EW (1982) Sizes and map positions of several plasmid-DNA-encoded transcripts in octopine-type crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:76—80
6. Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, Schilperoort RA (1982) In vitro transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* 296:72—74

7. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, Greve H De, Haernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J* 1:147—152
8. Marton L, Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort RA (1979) In vitro transformation of cultured cells from *N. tabacum* by *A. tumefaciens*. *Nature* 277:129—131
9. Memelink J, Schilperoort RA, Wullems GJ (1983) The nopaline T-DNA is maintained during regeneration and generative propagation of transformed tobacco plants. *Mol Gen Genet* 190:516—522
10. Ooms G, Hooykaas PJJ, Veen RJM Van, Beelen P, Van, Regensburg-Tuink TJG, Schilperoort RA (1982a) Octopine Ti plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7:15—29
11. Ooms G, Bakker A, Molendijk L, Wullems GJ, Gordon MP, Nester EW, Schilperoort RA (1982b) T-DNA organisation in homogenous and heterogenous octopine type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell* 30:589—597
12. Otten L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schieder O, Straub J, Schell J (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 183:209—213
13. Schröder J, Schröder G, Huisman H, Schilperoort RA, Schell J (1981) The mRNA for LpDH in plant tumor cells is complementary to a Ti plasmid fragment. *FEBS Lett* 129:166—168
14. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organisation of Ti plasmid sequences in crown gall. *Cell* 19:729—739
15. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) The Ti-DNA in octopine crown gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J* 1:139—146
16. Wullems GJ, Molendijk L, Schilperoort RA (1980) The expression of tumour markers in intraspecific somatic hybrids of normal and crown gall from *N. tabacum*. *Theor Appl Genet* 56:203—208
17. Wullems GJ, Molendijk L, Ooms G, Schilperoort RA (1981a) Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after in vitro transformation of *N. tabacum* protoplasts by *A. tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4344—4348
18. Wullems GJ, Molendijk L, Ooms G, Schilperoort RA (1981b) Retention of tumor markers in F1 progeny plants from in vitro induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24:719—727
19. Yang F, Simpson RB (1981) Revertant seedlings from crown gall tumors retain a portion of the bacterial Ti plasmid DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4151—4155
20. Zambrisky P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Montagu M Van, Goodman HM (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 209:1385—1391

32. ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ОПУХОЛЕРОДНОЙ ДНК НОПАЛИНОВОЙ Ti-ПЛАЗМИДЫ *AGROBACTERIUM* *TUMEFACIENS*

П. ЗАМБРИСКИЙ *

ВВЕДЕНИЕ

Корончатый галл — это неопластическая болезнь, поражающая большинство двудольных растений при заражении граммотрицательной почвенной бактерией *A. tumefaciens*. Корончато-галловые опухоли способны пролиферировать автономно в тканевой культуре, и в некоторых случаях из них можно регенерировать растения [2, 21, 28]. Опухолевое состояние ткани является результатом переноса ДНК из *A. tumefaciens* в растительные клетки (см. недавний обзор [15]). Эта природная система обмена генетическим материалом и индукции опухоли стала интенсивно изучаться не только потому, что она представляет научный интерес, но и ввиду возможности использования агробактерий для внесения новой генетической информации в растительные клетки на основе сочетания молекулярно-генетической инженерии с методами культуры растительных тканей.

Физическими и генетическими методами установлено, что агентом, ответственным за индукцию корончатых галлов, является большая опухолеродная Ti-плазмида размером около 200 т. п. н., которая содержится во всех онкогенных штаммах *A. tumefaciens*. В трансформированных растительных клетках содержится лишь часть Ti-плазмиды; этот переносимый сегмент назван Т-ДНК [1, 3, 18, 26]. О механизме переноса Ti-плазмидных последовательностей в растения почти ничего не известно. Наиболее вероятно, что перенос осуществляется в два этапа: 1) благодаря взаимодействию бактериальных и растительных клеток Ti-плазмида приобретает возможность проникнуть в растительную клетку и 2) часть Ti-плазмиды переносится в ДНК растения. Один из возможных путей выяснения механизма этого процесса — сопоставление последовательностей Ti-плазмиды *Agrobacterium* с конечной структурой Т-ДНК (т. е. после того, как она встроилась в геном растения). В настоящее время наиболее подробно исследована Т-ДНК в опухолях, индуцированных нопалиновыми штаммами *Agrobacterium*. Однако полученные недавно данные о структуре Т-ДНК, со-

* P. Zambryski, Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 25, 9000 Gent, Belgium.

держась в опухолях, индуцированных октопиновыми штаммами, свидетельствуют о том, что механизм интеграции в обоих типах агробактерий может быть сходным.

АНАЛИЗ ГРАНИЦ Т-ДНК С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ

Блоттинг-гибридизация растительной ДНК из нескольких независимых линий клетокнопалиновых опухолей позволила установить, что в процессе интеграции узнаются специфические последовательности на концах области Т-ДНК Тi-плазмиды; длина сегмента Т-ДНК, встроенного в растительную ДНК, относительно постоянна [18]. Показано, что Т-ДНК независимо возникших опухолей, индуцированныхнопалиновыми Тi-плазмидами, представляет собой непрерывный отрезок ДНК длиной 23 т. п. н., коллинеарный Т-области Тi-плазмиды.

Чтобы подробно изучить этот процесс, с помощью метода молекулярного клонирования были выделены «пограничные» участки Т-ДНК из нескольких линийнопалиновых опухолевых клеток [29, 30]. Была установлена нуклеотидная последовательность таких клонов, содержащих «пограничные» участки Т-ДНК, и точно определены места стыков Т-ДНК путем сравнения с последовательностями нуклеотидов в той же области Тi-плазмиды из *Agrobacterium* до ее переноса в растительные клетки. Анализ полученных до сих пор клонов дает некоторые сведения об общей организации Т-ДНК и указывает на довольно высокую точность механизма переноса.

Имеется два основных класса клонов, содержащих «пограничные» участки Т-ДНК, один из которых содержит последовательности, гомологичные левому и правому концам Т-ДНК. Структура таких клонов указывает на возможную организацию Т-ДНК в виде тандемных повторов. Хотя эти данные можно объяснить и существованием Т-ДНК в виде независимого репликаона, нам не удалось обнаружить наличие колец Т-ДНК в трансформированных растительных клетках. Второй класс «пограничных» клонов Т-ДНК содержит последовательности, которые на одном конце гомологичны Тi-плазмиде, а на другом — ДНК растения. Наличие таких клонов свидетельствует о том, что Т-ДНК может встраиваться в геном растительной клетки. Пограничные клоны, содержащие ДНК растения, гибридизуются либо с уникальной, либо с умеренно-, либо с высокоповторяющейся растительной ДНК. Следовательно, при интеграции в геном растения Т-ДНК не оказывает предпочтения какой-либо определенной последовательности.

Изнопалиновых опухолевых линий были изолированы шесть независимых клонов Т-ДНК. Три клона, 1, 1' и 2, ведут происхождение из опухолевой линии, индуцированнойнопалиновой Тi-плазмидой Т37, а клоны 3, 4 и 5 — из опухолевой линии, индуцированнойнопалиновой Тi-плазмидой С58. Точные последователь-

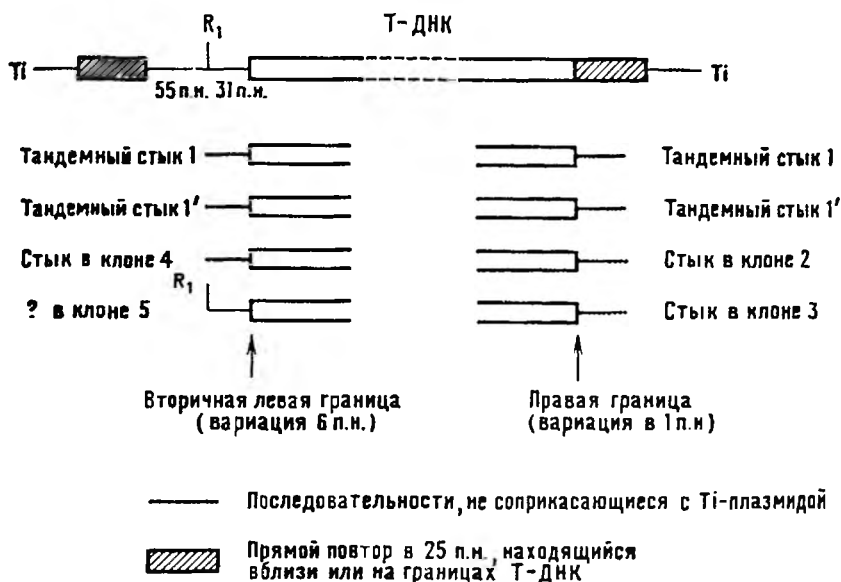


Рис. 32.1. Положение границ непалиновых Т-ДНК относительно непалиновой Ti -плазмиды. Границы непалиновых Т-ДНК изображены в сопоставлении с пограничными участками непалиновой Ti -плазмиды; точные нуклеотидные последовательности этих участков ДНК опубликованы [30]. Происхождение клонов 1, 1', 2, 3, 4 и 5 описано в тексте. Показан один *Eco*-RI-рестриктазный сайт близ левой границы Т-ДНК. Кроме того, указано относительное положение прямого повтора длиной 25 п. н., последовательность которого представлена на рисунке 32.2.

ности на границах всех этих клонов сравнили с последовательностями нуклеотидов, находящихся в том же участке Ti -плазмиды [30]. Клоны 1 и 1' произошли от тандемных стыков, поэтому каждый из них содержит левый и правый концы Т-ДНК, и для каждого из указанных клонов определены обе границы. На рисунке 32.1 схематически суммированы полученные результаты, из которых следует, что сайт интеграции Т-ДНК очень точен на правом конце и менее точен — на левом конце.

При анализе границ правых концов обнаружена вариация всего в один нуклеотид; она найдена в клоне 1', являющемся частью тандемной структуры. Особенно поражает то, что стык Т-ДНК/ДНК растения наблюдается точно по одной и той же паре нуклеотидов в Т-ДНК из двух независимых линий опухолей, индуцированных различными Ti -плазмидами (клоны 2 и 3). Левая граница чаще всего оказывается в варьирующем участке длиной примерно 6 п. н. Мы назвали эту границу вторичной, поскольку в других клонах границы располагались еще левее. Например, клон 5 фактически является внутренним фрагментом Т-ДНК, следовательно, граница Т-ДНК лежит левее *Eco*RI-сайта Ti -плазмиды, который находится в 31 п. н. слева от вторичной левой грани-

цы этого клона. Кроме того, в опухоли Т37 найдена еще одна левая граница, приблизительно в 95 п. н. слева от вторичной левой границы [27].

Сопоставление последовательностей Тi-плазмиды с пограничными последовательностями Т-ДНК не позволяет судить о механизме переноса Т-ДНК. Укажем, что вблизи концов Т-ДНК нет повторяющихся последовательностей, что часто наблюдается в других перемещающихся элементах. Из анализа нуклеотидных последовательностей на стыках Т-ДНК следует одно общее заключение о том, что они обогащены А—Т-парами непосредственно в сайтах стыков. Высокое содержание пар А—Т в сайтах интеграции представляется более или менее общим правилом для подвижных участков ДНК, справедливым для мест интеграции бактериофага λ в бактериальную ДНК [17, 22], предпочтительных мест включения прокариотических [5, 8, 16, 20, 23] и эукариотических транспозонов [4, 6, 24], а также сайтов интеграции ретровирусов [10, 19].

С целью получения более детальной информации о последовательностях ДНК, предположительно важных для переноса, мы анализировали первичную структуру участков Тi-плазмиды, непосредственно примыкающих к границам Т-ДНК. Одной из наиболее примечательных характеристик этих участков является наличие прямого повтора длиной 25 п. н., одна копия которого находится непосредственно справа от правой границы Т-ДНК, а другая начинается в 111 п. н. слева от вторичной левой границы. Эта последовательность приведена на рисунке 32.2, а ее положение относительно границ изображено на рисунке 32.1. Кроме того, очень сходная последовательность в виде прямого повтора найдена вблизи или непосредственно у правой и левой границ октопиновой Т-ДНК (TL), которая также представлена на рисунке 32.2 [13, 25]. В этом повторе имеются два домена гомологии из

ССТGG	TGGCAGGATATATTC	TG	GTGTA AAC	AAATT	Непалинивая L
ГТСТТ	TG(A)CAGGATATATTC	CC	CGGTA AAC	СТААГ	Непалинивая R
АСССГ	C(C)CCAGGATATATTC	AA	TTCTAAAT	СССТТ	Октопиновая L(TL)
СТСАС	TGGCAGGATATAT(A)C	CG	TTGTA A(T)T	ТGACC	Октопиновая R(TL)

Рис. 32.2. Прямые повторы в 25 п. н. на границах Т-ДНК непалиновых и октопиновых Тi-плазмид. Показан прямой повтор в 25 п. н., находящийся вблизи или на границах Т-ДНК в непалиновых и октопиновых Тi-плазмидах. В непалиновой Тi-плазмиде (pTiC58 или pTiT37) этот повтор встречается точно на правой границе Т-ДНК и начинается на расстоянии в 111 п. н. слева от вторичной левой границы. В октопиновой Тi-плазмиде (pTiAch5 или pTiA6S3) этот повтор встречается почти сразу за правой границей Т-ДНК; два стыка Т-ДНК, проанализированных к настоящему времени, варьируют в пределах 6 п. н. от этой последовательности (Р. Вилларель, М. Де Бойкелер, И. Гилен, Х. Де Греве, М. Хольстерс, *неопубликованные данные*). В одной опухолевой линии эта последовательность встречается точно на левой границе [25]. В двух других опухолевых линиях эта последовательность встречается либо на левой границе Т-ДНК, либо в 59 п. н. правее от нее [13].

15 п. н. и 8 п. н. Этот повтор представляется статистически весьма значимым: вероятность случайного обнаружения только одной последовательности из 15 п. н. составляет примерно 10^{-8} . Предположительная значимость этой последовательности будет проверена в опытах, в которых она будет специфически изменена мутациями. Хотя данных еще мало, можно уже говорить, что правая граница Т-ДНК, по-видимому, существенна для переноса Т-ДНК: протяженная делеция в этом участке резко снижает вероятность индукции опухоли [11, 14]. Вместе с тем протяженные делеции на левой границе Т-ДНК не оказывают влияния на онкогенность [14].

Любопытна структура тандемных Т-ДНК. Анализ первичной структуры показал, что стыки не являются точными соединениями левого и правого концов Т-ДНК. В клоне 1 последовательность на стыке содержит 136 п. н., а в клоне 1' — 22 п. н. Мы не знаем, как возникли эти стыкующие последовательности нуклеотидов, однако укажем, что они содержат последовательности, которые находятся также в Ti-плазмиде близ наблюдаемых границ Т-ДНК. Например, стыкующая последовательность клона 1 состоит из повторов в 12, 13, 14, 15, 18 и 28 п. н., однако эти повторы перетасованы по сравнению с их ориентацией и местоположением на концах Т-ДНК. Недавно было установлено, что октопиновая Т-ДНК (ТL) также имеет тандемную структуру и что, кроме того, ее стыкующая последовательность между тандемными копиями содержит повторяющиеся последовательности нуклеотидов [13].

На рисунке 32.3 упрощенно представлено все, что известно к настоящему времени о структуре нопалиновой Т-ДНК в растениях. Из этих данных также видно, насколько мало известно о механизме ее переноса. После переноса области Т-ДНК в геном растения она либо остается единственной копией, либо иногда может амплифицироваться, располагаясь в виде тандемов. Неясно, происходит ли подобная реорганизация как следствие исходного встраивания Т-ДНК или в результате рекомбинационных событий, приводящих к стабилизированной структуре. Сайт-специфичная амплификация ДНК — это свойство, присущее прокариотическим и эукариотическим геномам, и неудивительно, что внедрение чу-

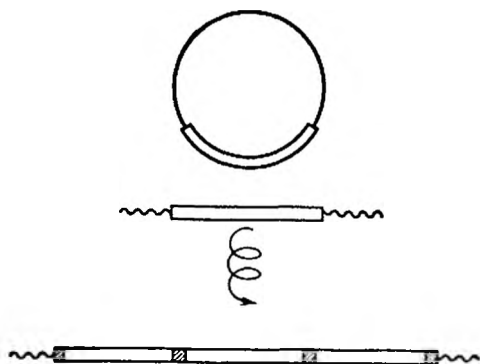


Рис. 32.3. Перенос и стабилизация Т-ДНК. Ti-Плазида изображена в виде окружности, а Т-ДНК — полоской. Волнистыми линиями изображена ДНК растения, а заштрихованными прямоугольниками — перестроенные последовательности на концах Т-ДНК. Все Т-ДНК расположены в прямой ориентации. Спиральной стрелкой изображена реакция, при которой происходит амплификация Т-ДНК.

жородной ДНК в ДНК восприимчивого хозяина вызывает некоторые перестройки в примыкающих последовательностях. Тандемизация может зависеть от участка растительного генома, служащего сайтом интеграции Т-ДНК.

АНАЛИЗ ГРАНИЦ Т-ДНК В СЛУЧАЕ, КОГДА ОНА ИСПОЛЬЗУЕТСЯ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ВСТРАИВАНИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

Специфичность переноса Т-ДНК можно также изучать, попытавшись интегрировать чужеродную ДНК в пределы Т-ДНК и пронаблюдав перенос такой структуры в геном растения. Это явление детально изучено для опухолевой линии, индуцированной нопалиновой плазмидой рTiT37::Tn7nos (pGV3171) [9, 12]. Транспозон Tn7 размером около 15 т. п. н. встроен в нее вблизи правого конца Т-области. Такая удлинённая Т-ДНК оказалась способной к переносу и интеграции в геном клеток табака. Таким образом, механизм, ответственный за перенос и встраивание Т-ДНК, должен узнавать специфические последовательности Ti-плазмиды на концах Т-ДНК, причем длина ДНК между этими концами не имеет критически важного значения. Кроме того, Т-ДНК, содержащая Tn7, была вновь выделена из ДНК опухолевых клеток путем молекулярного клонирования, и было показано, что этот Tn7 сохранил функции транспозиции и экспрессии маркеров устойчивости [12]. Следовательно, ДНК Tn7 не была модифицирована во время его пребывания в геноме растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Здесь мы суммируем все, что известно в настоящее время о переносе Т-ДНК из нопалиновых Ti-плазмид *Agrobacterium* в ДНК растительных клеток.

1. Интеграция Т-ДНК является точным процессом. Правая граница Т-ДНК варьирует в пределах 1 п. н., а левая граница — в пределах 10 п. н. Кроме того, внутри границ Т-ДНК может быть встроена чужеродная ДНК, которая переносится и встраивается в геном растения.

2. На границах Т-области Ti-плазмиды имеются последовательности (прямые повторы размером 25 п. н.), возможно, имеющие значение для эксцизии Т-области при переносе Т-ДНК.

3. Т-ДНК в геноме растения может быть представлена единичной копией или многими копиями, расположенными тандемно. Последовательности на стыках двух тандемных копий Т-ДНК зачастую состоят из повторов. Это означает, что в процессе тандемизации может осуществляться реорганизация концов Т-ДНК.

Эти результаты обнадеживают, поскольку свидетельствуют о том, что для переноса Т-ДНК существенны ограниченные участки Ti-плазмиды. Это очень важно для манипуляций *in vitro*, так как возникает возможность создания вектора, пригодного для встраи-

вания чужеродных генов и содержащего граничные участки Т-ДНК, что обеспечивает их перенос без индукции опухолей. Результаты недавних исследований Т-ДНК в растениях-регенерантах из опухолевых тканей свидетельствуют в пользу осуществимости этой идеи. Путем отбора против опухолевого роста у регенерантов можно добиться нормального развития благодаря возникновению делеций тех участков Т-ДНК, которые контролируют аномальный рост. Укороченная Т-ДНК стабильна и даже может передаваться через семена как менделирующий фактор [7, 21]. Таким образом, существует возможность создания подходящих делеций области Т-ДНК с сохранением ее концевых участков с целью получения Ti-плазмид, способных к переносу ДНК в реципиентные растения без нарушения их нормального роста.

Благодарности. Автор хотел бы выразить благодарность всем членам лабораторий профессоров М. Ван Монтегю и Дж. Шелла за их плодотворные дискуссии, постоянную помощь и поддержку в работе. Автор признателен ЕМВО за долгосрочную стипендию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall. *Mol Gen Genet* 183:283—288
2. Braun AC, Wood HN (1976) Suppression of the neoplastic state with the acquisition of specialized functions in cells, tissues, and organs of crown gall teratomas of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:496—500
3. Chilton M-D, Drummond HJ, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263—271
4. Dunsmuir P, Brorein WJ Jr, Simon MA, Rubin GM (1980) Insertion of the *Drosophila* transposable element copia generates a 5 base pair duplication. *Cell* 21:575—579
5. Emmelo J Van, Devos R, Ysebart M, Fiers W (1980) Construction and characterization of a plasmid containing a nearly full-size DNA copy of satellite tobacco necrosis virus RNA. *J Mol Biol* 143:259—271
6. Farabaugh PJ, Fink GR (1980) Insertion of the eukaryotic transposable element Ty1 creates a 5-base pair duplication. *Nature* 286:352—356
7. Greve H De, Leemans J, Hernalsteens JP, Thia-Toong L, Beuckeleer M De, Willmitzer L, Otten L, Montagu M Van, Schell J (1982) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 300:752—755
8. Heffron F, Kostriken R, Morita C, Parker R (1981) Tn3 encodes a site-specific recombination system: identification of essential sequences, genes, and the actual site of recombination. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 45:259—268
9. Hernalsteens JP, Vliet F Van, Beuckeleer M De, Depicker A, Engler G, Lemmers M, Holsters M, Montagu M Van, Schell J (1980) The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* 287:654—656
10. Hishinuma F, Bona PJ De, Astrin S, Skalka AM (1981) Nucleotide sequence of acceptor site and termini of integrated avian endogenous provirus ev1: integration creates a 6 bp repeat of host DNA. *Cell* 23:155—164
11. Holsters M, Silva B, Vliet F Van, Genetello C, Block M De, Dhaese P, Depicker A, Inzè D, Engler G, Villarroel R, Montagu M Van, Schell J (1980)

- The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. Plasmid 3:212—230
12. Holsters M, Villarroel R, Montagu M Van, Schell J (1982) The use of selectable markers for the isolation of plant-DNA/T-DNA junction fragments in a cosmid vector. Mol Gen Genet 185:283—289
 13. Holsters M, Villarroel R, Gielen J, Seurinck J, De Greve H, Montagu M Van, Schell J (1983) An analysis of the boundaries of the octopine TL-DNA in tumors induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 190:35—41
 14. Joos H, Inzé D, Caplan A, Sormann M, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. Cell 32:1057—1067
 15. Kahl G, Schell J (1982) Molecular biology of plant tumors. Academic Press, London New York
 16. Kühn S, Fritz HJ, Starlinger P (1979) Close vicinity of IS1 integration sites in the leader sequence of the gal operon of *E. coli*. Mol Gen Genet 167:235—241
 17. Landy A, Ross W (1977) Viral integration and excision: structure of the lambda att sites. Science 197:1147—1160
 18. Lemmers M, Beuckeleer M De, Holsters M, Zambryski P, Depicker A, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1980) Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. J Mol Biol 144:353—376
 19. Majors JE, Varmus HE (1981) Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumour virus. Nature 289:253—257
 20. Miller JH, Calos MP, Galas D, Hofer M, Büchel DE, Müller-Hill B (1980) Genetic analysis of transpositions in the lac region of *Escherichia coli*. J Mol Biol 144:1—18
 21. Otten L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schieder O, Straub J, Schell J (1981) Mendelian transmission of genes introduced in plant by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Gen Genet 183:209—213
 22. Pinkham JL, Platt T, Enquist L, Weisberg RA (1980) The secondary attachment site for bacteriophage λ in the *proA/B* gene of *Escherichia coli*. J Mol Biol 144:587—592
 23. Reed RR (1981) Resolution of cointegrates between transposons $\gamma\delta$ and Tn3 defines the recombination site. Proc Natl Acad Sci USA 78:3428—3432
 24. Roeder GS, Farabaugh PJ, Chaleff DT, Fink GR (1980) The origins of gene instability in yeast. Science 209:1375—1380
 25. Simpson RB, D'Hara PJ, Krook W, Montoya AL, Lichtenstein C, Gordon MP, Nester EW (1982) DNA from the A6S/2 crown gall tumors contains scrambled Ti-plasmid sequences near its junctions with the plant DNA. Cell 29:1005—1014
 26. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organisation of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. Cell 19:729—739
 27. Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton M-D (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. Proc Natl Acad Sci USA 79:6322—6326
 28. Yang F, Simpson RB (1981) Revertant seedlings from crown gall tumors retain a portion of the bacterial Ti plasmid DNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 78:4151—4155
 29. Zambryski P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Montagu M Van, Goodman HM (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. Science 209:1385—1391
 30. Zambryski P, Depicker A, Kruger K, Goodman H (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. J Mol Appl Genet 1:361—370

33. ТРАНСКРИПЦИЯ Ti-ПЛАЗМИДЫ В КОРОНЧАТО-ГАЛЛОВЫХ ОПУХОЛЯХ

С. ГЕЛВИН, С. КАРЧЕР, В. ДИ РИТА и Э. ТАЛИЕРСИО *

ВВЕДЕНИЕ

Т-Область Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* является уникальным сегментом ДНК в том отношении, что она представляет собой единственную известную в настоящее время нуклеиновую кислоту, способную к естественному обмену между организмами разных филогенетических царств [2, 19, 27, 28, 32, 33]. Публикуется все больше данных, свидетельствующих о том, что Т-ДНК может транскрибироваться как в эукариотическом [10, 11, 15, 30], так и в прокариотическом [10] хозяевах. Несмотря на то что транскрипты, закодированные в Т-ДНК, которые обнаруживаются в корончатых галлах, обладают многими общими чертами с другими эукариотическими мРНК, включая транскрипцию РНК-полимеразой II [31], полиаденилирование на 3'-конце [10, 11, 30] и, вероятно, кэппирование 5'-конца [24], детали этих механизмов и регуляции транскрипции еще неясны.

В более ранних исследованиях корончатых галлов как октопинового, так и нопалинового типа идентифицированы участки Т-ДНК, которые экспрессируются с образованием мРНК [10, 15]. Было также показано, что количество РНК, кодируемых различными участками Т-ДНК, зачастую значительно варьирует. В недавних опытах по РНК-блоттингу более точно определены количество и относительные уровни мРНК, относящихся к дискретным участкам TL-области в нескольких корончато-галловых опухолях октопинового типа [11, 30]. Эта область, обнаруженная у всех изучавшихся до сих пор опухолей октопинового типа [27], содержит информацию, необходимую для поддержания опухоли и синтеза октопина. Генетический анализ с применением транспозонного [4, 7, 8, 16, 17, 22] и делеционного [18, 23] мутагенеза и изучения фенотипа опухолей, несущих мутагенизированную Т-ДНК, позволил выявить четыре дискретных участка области TL: 1) участок, по-видимому, вовлеченный в синтез или регуляцию активности ауксина растениями (локус побегообразования, или TMS);

* S. B. Gelvin, S. J. Karcher, V. J. Di Rita, and E. W. Talericio, Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.

2) участок, по-видимому, играющий роль в синтезе или регуляции активности цитокининов растениями (локус корнеобразования, или TMR); 3) участок, вероятно, регулирующий скорость роста опухолей (TML); 4) локус, кодирующий октопирсинтетазу — фермент, ответственный за синтез октопина в опухолях [8]. Каждый из перечисленных локусов кодирует дискретные макромолекулы РНК [11, 30]. Дополнительно мРНК кодируются и другими участками TL-области; мутации в них не влияют на фенотип опухолей [8, 11, 30].

Помимо TL-области, во многих опухолях октопинового типа присутствует одна или несколько копий соседнего участка Ti-плазмиды, названного TR-областью [27]. Хотя функция или функции TR в опухоли еще неизвестны, предполагают, что этот сегмент Т-ДНК определяет синтез недавно открытых соединений маннопина и агропина в некоторых опухолях [5]. В настоящей статье мы сообщаем размеры и положения на карте четырех транскриптов, кодируемых TR-областью. Мы также демонстрируем, что относительный уровень этих РНК может колебаться в разных линиях опухолей и даже в одной данной линии при росте в разных условиях. Мы начали также изучение роли двух аспектов структуры ДНК — конформации хроматина и степени метилирования ДНК, которые могут затрагивать транскрипцию Т-ДНК в корончатых галлах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Картирование транскриптов в пределах TR-области Т-ДНК

Корончато-галловая опухоль табака Е9 наряду с 1—2 копиями TL содержит 15—30 копий TR-области, включающей *EcoRI*-фрагмент 13 и протянувшейся до соседних *EcoRI*-фрагментов 22 и 24. Хотя в Ti-плазмиде *A. tumefaciens* области TL и TR прилегают друг к другу, в опухоли Е9 они разобщены [27]. Рестрикционные фрагменты, ведущие свое происхождение от *Bam*HI-фрагмента 2 Ti-плазмиды рTiВ₈806, клонировали в клетках *E. coli*. Эти

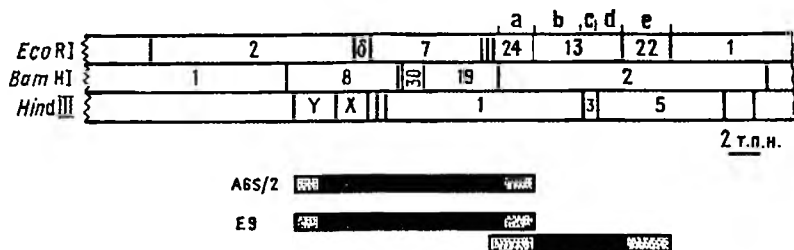


Рис. 33.1. Рестрикционная карта Т-ДНК типичной Ti-плазмиды октопинового типа. Буквами над картой обозначены субклонированные участки *Bam*HI-фрагмента 2. Черными прямоугольниками под картой обозначены участки Т-ДНК в каждой опухолевой линии. Точками в прямоугольниках указаны участки, в которых Т-ДНК стыкуется с ДНК растения.

фрагменты, обозначенные 2_{a-e3}, охватывают всю область TR (рис. 33.1).

Суммарную РНК или полиаденилированную РНК изолировали из суспензионной или каллусной культуры Е9 и подвергали электрофорезу в денатурирующих гелях 2%-ной агарозы с 6%-ным формальдегидом [11]. РНК переносили на нитроцеллюлозу [26] и гибридизовали с радиоактивными TR-субклонами. Полученные результаты представлены на рисунке 33.2. Обнаружено четыре дискретных транскрипта: сравнительно обильная РНК 0,78 т. н. и сравнительно редкая РНК 1,05 т. н., проявляющие гибридиза-

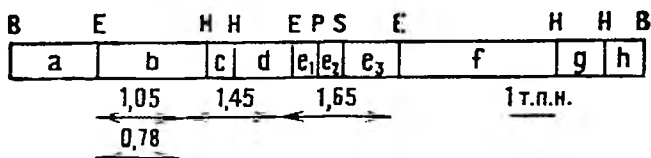
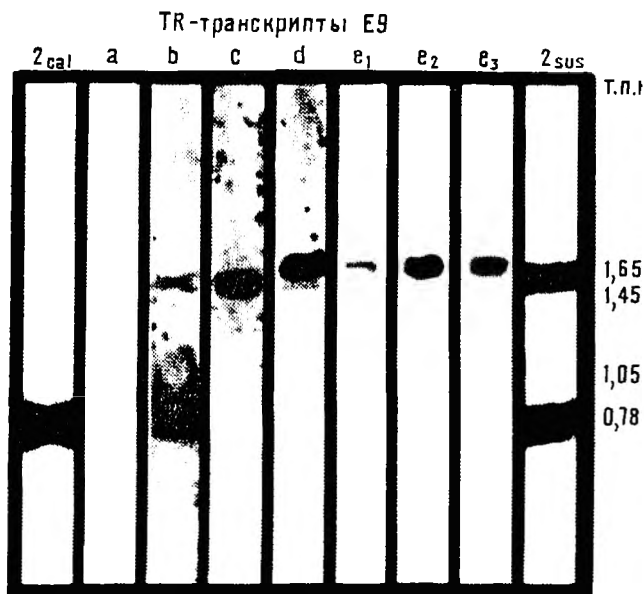


Рис. 33.2. РНК-Блоттинг транскриптов Т-области корончато-галловой опухоли Е9. Суммарную РНК опухоли Е9 подвергали электрофорезу в денатурирующих агарозных гелях, переносили на нитроцеллюлозу и гибридизовали с радиоактивными пробами Т-ДНК. Буквами над дорожками указаны субклоны *Bam*HI-фрагмента 2, использованные в качестве проб. Карта этих участков показана внизу. 2_{cal} и 2_{sus} — гибридизация с *Bam*HI-фрагментом 2 РНК, выделенной из каллусных и суспензионных клеток линии Е9 соответственно. Рестрикционные сайты:

В — *Bam*HI; Е — *Eco*RI; Н — *Hind*III; Р — *Pst*I; S — *Sal*I.

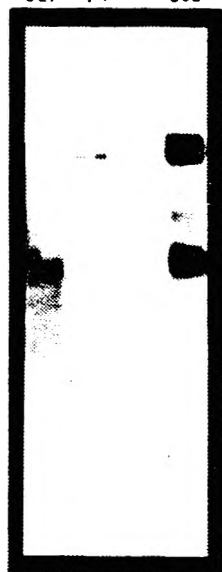
Рис. 33.3. РНК-Блоттинг транскриптов TR-области различных клеточных линий. Гибридизационной пробой был *Vam*HI-фрагмент 2. Для каждой дорожки брали 2 мкг суммарной клеточной РНК:

$E9_{cal}$ и $E9_{sus}$ — РНК из каллусных и суспензионных клеток соответственно; 15955/1 — одна из опухолевых линий табака октопинового типа; XSR — нетрансформированное растение *N. tabacum* сорта Xanthi.

TR-транскрипты

$E9$ 15955 XSR $E9$
cal /1 sus

т.п.н.



1,65

1,45

1,05

0,78

цию целиком в пределах участка 2b; транскрипт размером 1,45 т. н., прос-тирающийся от участка 2b через 2c до 2d; четвертый транскрипт (1,65 т. н.), протянувшийся от участка 2d через 2e₁ и 2e₂ до участка 2e₃. Два послед-них класса РНК, хотя и умеренно обильные в опухолевых клетках $E9$, выращиваемых в суспензионной куль-туре (2_{sus} на рис. 33.2), сравнительно редки, когда та же ткань растет на твердом агаре в виде каллуса (2_{cal} на рис. 33.2). Следовательно, установив-шиеся уровни TR-транскриптов линии $E9$ могут колебаться в зависимости от условий роста клеток.

Блоттинг-гибридизация TR-транскриптов была проведена так-же для другой опухолевой линии табака (15955/1), в которой со-держится одна копия TR [27] (рис. 33.3). Найден лишь транскрипт 1,45 т. н., несмотря на то что эта опухоль содержит участок 2b полной длины [27]. На рисунке 33.3 также показано, что нетранс-формированный каллус XSR сорта Xanthi *N. tabacum* не содер-жит транскриптов, гомологичных *Vam*HI-фрагменту 2. Из каждой линии клеток анализировали равные количества суммарной кле-точной РНК (рис. 33.3). Хотя в опухоли $E9$ содержится в 15—30 раз больше копий TR-ДНК, чем в опухоли 15955/1, установив-шийся уровень TR-транскрипта 1,45 т. н. в суспензионной куль-туре линии $E9$ лишь в 3—5 раз выше. Это может быть указанием на то, что в данной линии транскрибируются не все копии TR-об-ласти. Возможны и другие объяснения, например пониженная ини-циация транскрипции или пониженная стабильность РНК в клет-ках суспензии $E9$.

Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что мно-гие опухоли, содержащие области TR и TL, в отличие от опухо-лей, которые содержат лишь TL, способны синтезировать опины агропин и (или) маннопин (Дж. Кемп, личное сообщение). В таб-лице 33.1 показано, что как суспензионные, так и каллусные куль-туры $E9$ продуцируют большие количества маннопина и агропина. Каллус 15955/1 также продуцирует обнаружимые уровни обоих этих соединений. Эти результаты наряду с данными транскрипци-

33.1. Синтез маннопина и агропина в линиях корончатых галлов

Линия	Синтез маннопина	Синтез агропина
Е9 (каллус)	+++	+++
Е9 (суспензия)	+++	+++
15955/1	+	+

онного анализа, обсужденными выше, свидетельствуют о том, что белок, кодируемый транскриптом 1,45 т. н., участвует в биосинтезе указанных опинов.

Структура Т-ДНК в корончатом галле

Хроматин эукариотических организмов организован в виде дезоксирибонуклеопротеиновых комплексов, называемых нуклеосомами. Из этих нуклеосом после мягкого расщепления ДНК в ядрах нуклеазой микрококков можно с помощью электрофореза в агарозном геле выделить мультимеры, состоящие из мономеров по 165—220 п. н. ДНК. В свете данных о роли структуры хроматина в регуляции транскрипции генов у животных [6, 9, 12, 13, 29] представляло интерес изучить влияние структуры хроматина в корончатых галлах на выражение Т-ДНК. Первый этап состоял в выделении ДНК из нуклеосом этих опухолей.

На рисунке 33.4 показана типичная лесенка нуклеосомной ДНК из опухоли А6S/2. Сейчас мы проводим блоттинг-гибридизацию ДНК из таких гелей с клонированными фрагментами Т-ДНК, чтобы установить, упакована ли Т-ДНК, находящаяся в опухоли, в нуклеосомной конформации.



Рис. 33.4. Профиль нуклеосомной ДНК из ядер опухоли А6S/2. Ядра выделяли из опухолевой линии А6S/2, инкубировали с различными количествами ДНКазы 1, ДНК экстрагировали и подвергали электрофорезу в 1,8 %-ном агарозном геле:

дорожка 1 — ДНК из неинкубированных ядер; дорожки 2—6 — ДНК из ядер, обработанных соответственно 0, 50, 100, 250 и 500 единицами ДНКазы 1/мл (рН 7,0).

Метилирование Т-ДНК в агробактерии и корончатом галле

Метилирование ДНК у эукариот имеет отношение к регуляции генной активности. За немногими исключениями транскрипционно активные гены у животных в целом метилированы слабее, чем неактивные гены [3, 21]. В ядерной ДНК растений метилируется цитозин, превращаясь в 5-метилцитозин, а узнаваемой последовательностью для растительной ДНК-метилазы (метилаз) является 5'СХG3', в которой Х может быть любым из четырех оснований. В более 80 % случаев Х представлен цитозином [14]. В сайтах узнавания рестриктаз *MspI* и *HpaII* содержится последовательность 5'CCGG3'. *MspI* расщепляет ДНК, если не метилирован внешний цитозин указанной последовательности, а *HpaII* разрывает ДНК, если не модифицирован внутренний цитозин. Вот почему эти ферменты служат полезными диагностическими инструментами для измерения степени метилирования определенных сайтов в ДНК.

ДНК октопиновой плазмиды рTiВ₈806, выделенной из штамма *A. tumefaciens* А277, расщепляли *MspI* или *HpaII*, подвергали электрофорезу в агарозных гелях, переносили на нитроцеллюлозу [25] и гибридизовали с клонированными рестрикционными *BamHI*-фрагментами, охватывающими всю Т-ДНК. Из рисунка 33.5 видно, что рестрикционные профили этих фрагментов Т-ДНК после расщепления рестриктазой *MspI* или *HpaII* идентичны. Другие данные (не представленные) показывают, что профили, полученные расщеплением клонированных фрагментов Т-ДНК в клетках *E. coli* (в которых последовательность ДНК 5'CCGG3' не метилируется), идентичны показанным профилям. Следовательно, Т-ДНК в клетках *A. tumefaciens* по последовательности 5'CCGG3' не метилируется.

Затем мы расщепили ДНК из корончато-галловой опухоли А6S/2 рестриктазами *MspI* или *HpaII* и проанализировали Т-ДНК по степени метилирования, как описано выше. В опухоли А6S/2 содержится единственная копия ТL-области Т-ДНК [27]; эта область транскрибируется в опухоли [10, 11]. Сопоставление гибридационных профилей, представленных на рисунках 33.6 и 33.5, свидетельствует о том, что Т-ДНК данной опухолевой линии не метилируется по последовательности 5'CCGG3'.

Как упоминалось выше, в опухоли Е9 содержится 1—2 копии ТL- и 15—30 копий TR-области [27]. Как ТL-, так и TR-область в этой опухоли транскрибируются [10, 11]. Рестрикционный анализ Т-ДНК из каллусных культур опухолевой линии Е9 с применением ферментов *MspI* и *HpaII* показывает, что ТL-ДНК не метилируется по последовательности 5'CCGG3' (рис. 33.7). Одна или несколько копий TR также не метилированы. Большинство же копий TR сильно метилированы либо по внутреннему, либо по внешнему цитозинному остатку, либо по обоим одновременно. На это указывает большое число высокомолекулярных рестрикционных фрагментов TR-ДНК опухолевой линии Е9 в отличие от неметилиро-

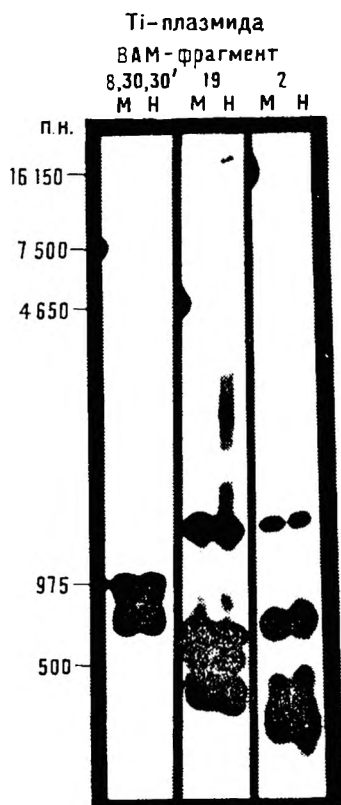


Рис. 33.5

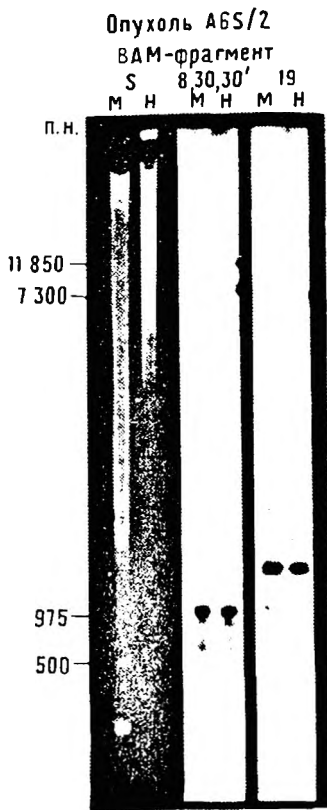


Рис. 33.6

Рис. 33.5. *MspI*- и *HpaII*-Фрагменты Т-ДНК из Ti-плазмиды рTiВ₆806. ДНК расщепляли рестриктазой *MspI* (М) или *HpaII* (Н), подвергали электрофорезу, переносили на нитроцеллюлозу и гибридизовали с радиоактивными клонами Т-ДНК. *BamHI*-Фрагмент, взятый в качестве пробы, указан над каждым набором дорожек.

Рис. 33.6. *MspI*- и *HpaII*-Фрагменты Т-ДНК из опухоли А6S/2. Подробности экспериментов см. в подписи к рисунку 33.5.

ванной Ti-плазмиды (ср. с рис. 33.5). По аналогии с метилированием ДНК и инактивацией генов в животных системах на основании представленных данных можно предположить, что большинство копий TR-области в калусных культурах рассматриваемой опухоли не транскрибируется.

ОБСУЖДЕНИЕ

TR-Область корончатых галлов октопинового типа обладает многими свойствами, идеальными для генетического и молекулярного анализа. Она способна ковалентно встраиваться в ядерную

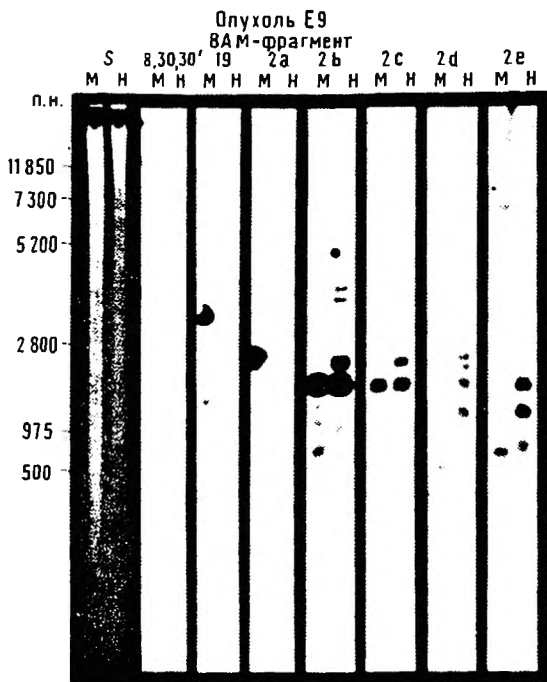


Рис. 33.7. *MspI*- и *HpaI*-фрагменты Т-ДНК из опухоли E9. Подробности экспериментов см. в подписи к рисунку 33.5.

ДНК растения во многих опухолевых линиях, иногда в большом числе копий [27]. Установившиеся уровни транскриптов с этой области относительно высоки по сравнению с уровнями РНК, кодируемых TL-областью ([10], Карчер и Гелвин, *неопубликованные данные*), что облегчает транскрипционный анализ. Большое число копий TR в некоторых линиях опухолей представляет привлекательную систему для изучения возможностей дифференциальной транскрипции множественных вставок Т-ДНК. Наконец (и это может оказаться наиболее важным при использовании Т-ДНК в качестве вектора для доставки чужеродных генов в растительные клетки в опытах по геной инженерии), TR не кодирует функций, необходимых для поддержания опухоли, о чем свидетельствует отсутствие TR-последовательностей в некоторых корончатых галлах октопинового типа [27]. С учетом всего этого недавно было начато всестороннее исследование структуры и выражения TR-последовательностей в Т-ДНК корончатых галлов. Эти исследования охватят молекулярную и генетическую стороны функционирования TR-области от уровня первичной структуры до структуры хроматина.

На первом этапе этих исследований были проанализированы транскрипты, кодируемые областью TR в двух линиях коронча-

тых галлов табака, Е9 и 15955/1. В опухолевой линии Е9 найдены четыре дискретных класса РНК в популяциях как суммарной, так и полиаденилированной РНК. Установившиеся уровни этих транскриптов подвержены заметным колебаниям. Во всех 10 препаратах РНК Е9 класс РНК длиной 0,78 т. н. был относительно обильным, а РНК 1,05 т. н. — сравнительно редким. В некоторых препаратах не обнаружено РНК 1,05 т. н. Два других класса РНК, 1,45 и 1,65 т. н., были умеренно обильными в клеточных суспензиях Е9, однако установившиеся уровни этих двух транскриптов были значительно ниже в двух препаратах, приготовленных из каллуса линии Е9. Неизвестно, отражают ли несопоставимые уровни этих транскриптов различия в инициации транскрипции, элонгации, транспорте в цитоплазму или стабильности РНК. Подобные различия уровней ТL-транскриптов были описаны для других опухолевых линий, выращивавшихся в разных условиях [31].

Несмотря на то что в опухолевой линии 15955/1 содержится EcoRI-фрагмент 13 полной длины (участки 2_{b-d} на рис. 33.1) ([27], Гелвин, *неопубликованные данные*), в ней обнаруживается лишь один из транскриптов (класс РНК 1,45 т. н.), содержащихся в опухоли Е9. Причина этого также неизвестна. Данная опухолевая линия на табаке была иницирована штаммом *A. tumefaciens*, содержащим Ti-плазмиду pTi15955, которая в высокой степени гомологична Ti-плазмиде pTiВ₆806, использованной для инициации опухоли Е9 [27]. Интересно отметить, что в опухоли подсолнечника, индуцированной плазмидой pTi15955, также синтезируется только РНК 1,45 т. н. [20]. (В указанной работе размер обсуждаемого транскрипта определен в 1,6 т. н., однако он картируется в том же месте, что и описанный нами транскрипт 1,45 т. н.) Возможно, что pTi15955 несет небольшие мутации, не выявляемые рестрикционным анализом, которые приводят к подавлению транскрипции других TR-РНК, обнаруженных в опухоли Е9.

Хотя еще не установлены функции четырех генов, выявленных в TR-области опухоли Е9, мы обсудим возможные функции РНК 1,45 т. н., представляющей единственный TR-транскрипт опухолевой линии 15955/1. Эта опухоль продуцирует маннопин и агропин. Включение фазеолинового гена в HindIII-сайт, через который транскрибируется РНК 1,45 т. н., ведет к образованию опухолей, не синтезирующих ни один из этих опинов (Дж. Кемп, *личное сообщение*). Поэтому возможно, что транскрипт 1,45 т. н. кодирует функцию (функции), необходимую для синтеза маннопина и агропина.

Мы исследовали Т-ДНК в отношении метилирования по последовательности 5'CCGG3' как в Ti-плазмиде, так и в ядерной ДНК растения, в которую она была интегрирована. Это осуществлялось путем расщепления различных образцов ДНК специфичными по метилированию изошизомерными рестриктазами *MspI* и *HpaII*, последующим электрофорезом фрагментов, перенесением их на нитроцеллюлозу и гибридизацией с различными радиоактивными пробами Т-ДНК. Результаты опытов показали, что

Т-ДНК не метилируется по указанным последовательностям, когда она находится в Ti-плазмиде рTiB₆806 в агробактериях. Кроме того (данные не представлены), за двумя небольшими исключениями, Т-ДНК не метилируется по данным последовательностям также и в нопапиновой Ti-плазмиде рTiT37. Метилирование Т-ДНК не наблюдается и в опухоли А6S/2 (содержащей только одну копию TL), и в единственной копии TL в опухоли Е9. По меньшей мере одна копия TR в опухоли Е9 также не метилируется, однако в этой опухолевой линии наблюдается интенсивное метилирование Т-ДНК в большинстве из 15—30 копий области TR. Другие данные (не представлены) свидетельствуют, что в октопиновых опухолях 15955/1 и 15955/01, а также в нопапиновой опухоли HT37#15 хотя бы одна копия Т-ДНК не метилируется по последовательностям 5'CCGG3'. Однако их метилирование возможно, когда Т-ДНК присутствует в нескольких копиях.

Во всех изученных опухолях хотя бы одна копия Т-ДНК не была метилирована. В животных системах пониженное метилирование ДНК коррелирует с транскрипционной активностью [3, 13, 21]. Если такая корреляция имеет место и в корончатых галлах, то результаты экспериментов с опухолевой линией Е9 свидетельствуют о том, что большинство копий TR не транскрибируется. Поэтому высокие уровни транскриптов с TR-области по сравнению с TL-областью в данной опухолевой линии можно объяснить сильными промоторами в TR-ДНК. Однако возможны и другие объяснения.

При встраивании Т-ДНК Ti-плазмиды в ядерную ДНК растения она может обретать специфические черты, характерные для ДНК эукариот, например метилирование последовательности 5'CCGG3'. В настоящее время ведутся опыты с целью выяснения того, способна ли Т-ДНК образовывать нуклеосомную структуру в ядре растения и проявляют ли активно транскрибируемые гены Т-ДНК повышенную чувствительность к ДНКазе I.

Благодарности. Авторы хотели бы поблагодарить Ж. Рихтер за техническую помощь, доктора П. Голдсброу за критическое прочтение рукописи и М. Майлса за помощь в подготовке рукописи. Авторы признательны доктору Дж. Кемпу за проведение тестов на содержание агропина и маннопина. Работа частично финансировалась Национальным научным фондом (США) и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bird AP, Taggart MH (1980) Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Res* 8:1485—1497
2. Chilton M-D, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263—271
3. Compere SJ, Palmiter RD (1981) DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-1 gene in lymphoid cells. *Cell* 25:233—240
4. DeGreve H, Decraemer H, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1981) The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6S3. *Plasmid* 6:235—248

5. Firmin JL, Fenwick K (1978) Agropine—a major new plasmid-determined metabolite in crown gall tumours. *Nature* 276:842—844
6. Garel A, Axel R (1976) Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3966—3970
7. Garfinkel DJ, Nester EW (1980) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol* 144:732—743
8. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
9. Gazit B, Panet A, Cedar H (1980) Reconstruction of a deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1787—1790
10. Gelvin SB, Gordon MP, Nester EW, Aronson AI (1981) Transcription of the *Agrobacterium* Ti plasmid in the bacterium and in crown gall tumors. *Plasmid* 6:17—29
11. Gelvin SB, Thomashow MF, McPherson JC, Gordon MP, Nester EW (1982) Sizes and map positions of several plasmid-DNA-encoded transcripts in octopine-type crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:76—80
12. Groudine M, Weintraub H (1981) Activation of globin genes during chicken development. *Cell* 24:393—401
13. Groudine M, Eisenman R, Weintraub H (1981) Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. *Nature* 292:311—317
14. Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H, Razin A (1981) Sequence specificity of methylation of higher plant DNA. *Nature* 292:860—862
15. Gurley WB, Kemp JD, Albert MJ, Sutton DW, Callis J (1979) Transcription of Ti plasmid-derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2828—2832
16. Klapwijk PMJ, Breukelen J Van, Korevaar K, Ooms G, Schilperoort RA (1980) Transposition of Tn 904 encoding streptomycin resistance in the octopine Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 141:129—136
17. Koekman BP, Ooms G, Klapwijk PM, Schilperoort RA (1979) Genetic map of an octopine Ti plasmid. *Plasmid* 2:347—359
18. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, DeGreve H, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J* 1:147—152
19. Lemmers M, Beuckeleer M De, Holsters M, Zambryski P, Depicker A, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1980) Internal organization, boundaries, and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumors. *J Mol Biol* 144:353—376
20. Murai N, Kemp JD (1982) T-DNA of pTi-15955 from *Agrobacterium tumefaciens* is transcribed into a minimum of seven polyadenylated RNAs in a sunflower crown gall tumor. *Nucleic Acids Res* 10:1679—1689
21. Naveh-Many T, Cedar H (1981) Active gene sequences are undermethylated. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4246—4250
22. Ooms G, Hooykaas PJJ, Moolenaar G, Schilperoort RA (1981) Crown gall plant tumors of abnormal morphology induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids: analysis of TIDNA functions. *Gene* 14:133—150
23. Ooms G, Hooykaas PJJ, Vleen RJM Van, Beelan P Van, Regensburg-Tuink TJG, Schilperoort RA (1982) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7:15—29
24. Schröder G, Schröder J (1982) Hybridization selection and translation of T-DNA encoded mRNAs from octopine tumors. *Mol Gen Genet* 185:51—55
25. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503—518
26. Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201—5205
27. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980a) Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19:729—739

28. Thomashow MF, Nutter R, Postle K, Chilton M-D, Blattner FR, Powell A, Gordon MP, Nester EW (1980b) Recombination between higher plant DNA and the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci USA 77:6448—6452
29. Weintraub H, Larsen A, Groudine M (1981) α -globin-gene switching during the development of chicken embryos: expression and chromosome structure. Cell 24:333—344
30. Willmitzer L, Otten L, Simons G, Schmalenbach W, Schröder J, Schröder G, Montagu M Van, Vos G De, Schell J (1981a) Nuclear and polysomal transcripts of T-DNA in octopine crown gall suspension and callus cultures. Mol Gen Genet 182:255—262
31. Willmitzer L, Schmalenbach W, Schell J (1981b) Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumors is inhibited by low concentrations of α -amanitin. Nucleic Acids Res 9:4801—4812
32. Yadav NS, Postle K, Saiki RK, Thomashow MF, Chilton M-D (1980) T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. Nature 287:458—461
33. Zambryski P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Montagu M Van, Goodman HM (1980) Tumor DNA structure in plant cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Science 209:1385—1391

34. TR-ГЕНЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СИНТЕЗЕ АГРОПИНА

И. ВЕЛЬТЕН*, Л. ВИЛЬМИТЦЕР*, И. ЛЕЕМАНС**,
И. ЭЛЛИС***, Р. ДЕБЛЕР**, М. ВАН МОНТЕГЮ***, ***
и ДЖ. ШЕЛЛ*, ***

ВВЕДЕНИЕ

Крайнюю правую часть, или TR-область, Т-ДНК Ti-плазмиды октопинового типа часто, но не всегда, находят в растительных тканях, трансформированных определенными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* [1, 9]. Опухолевые ткани, не содержащие TR, не проявляют внешних морфологических отличий от TR-содержащих опухолевых линий. Следовательно, TR-область, видимо, не кодирует генетическую информацию, необходимую для онкогенеза или поддержания опухоли. Однако TR-ДНК активно транскрибируется в растительной ткани и ответственна за один известный фенотипический признак — биосинтез опинов агропинового семейства [5]. Биосинтез агропина наблюдался также в опухолях, индуцированных Ti-плазмидами агропинового типа [4], и в тканях корней, трансформированных бактерией *A. rhizogenes* [8].

Мы анализировали выражение TR-области в следующих системах: 1) опухолевых тканях табака, индуцированных Ti-плазмидами, содержащими мутированные *in vitro* TR-области, и 2) мутантных по TR-области тканях, спонтанно возникших при размножении опухолевых линий. В трансформированной растительной ткани выявлено образование пяти TR-специфичных транскриптов. По крайней мере, три из них вовлечены в биосинтез опинов.

КАРТИРОВАНИЕ TR-ТРАНСКРИПТОВ

Размеры транскриптов и приблизительное местоположение соответствующих кодирующих участков в пределах области TR определены блоттинг-гибридизацией РНК из опухолевой линии IGV7 (индуцированной на сорте Wisconsin 38 *Nicotiana tabacum* бактерией *A. tumefaciens*, несущей плазмиду pGV2208 [5]). Электро-

* J. Velten, L. Willmitzer, J. Shell, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 5000, Köln 30, BRD.

** J. Leemans, R. Deblaere, M. Van Montagu, Laboratorium voor Genetische Virologie, Vrije Universiteit Brussel, 1640 Dt.-Genesius-Rode, Belgium.

*** J. Ellis, M. Van Montagu, J. Shell, Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, 9000 Gent, Belgium.

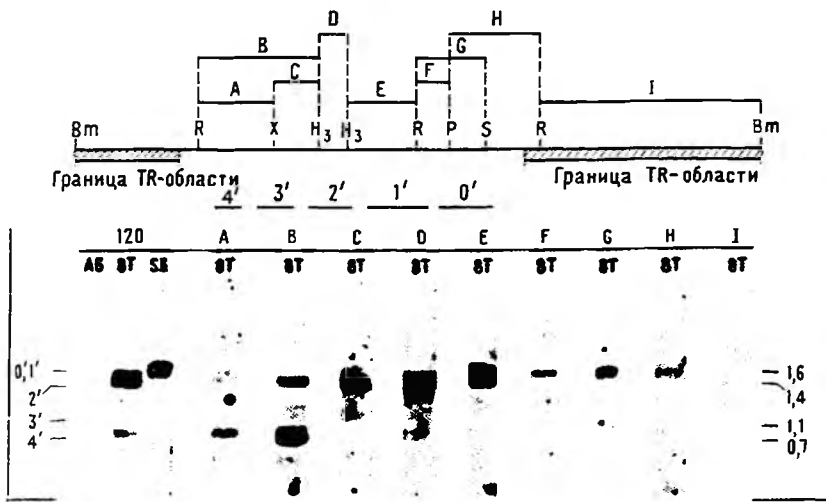


Рис. 34.1. Карта TR-транскриптов опухолевой ткани. Фрагменты А—I TR-области метили ^{32}P и гибридизовали с электрофоретически разделенными полиА⁺-молекулами РНК, фиксированными на бумаге ДБМ (диазобензилоксиметил). Показаны гибридизационные профили для каждого фрагмента. Указаны размеры и примерные местоположения каждого из TR-транскриптов (1'—4'). РНК выделяли из нескольких опухолевых линий: в линии А6-S1 (А6) не содержится TR-ДНК [1], линия 1GV7 (8Т) была индуцирована Тi-плазмидой рGV2208, в линии 1GV23-S6 (S6) обнаруживается только 1'-транскрипт.

форетически разделенные полиА⁺РНК переносили на бумагу ДБМ и гибридизовали с различными ^{32}P -мечеными фрагментами ДНК TR-области. Таким способом в опухолевой ткани выявлены пять TR-специфичных транскриптов: три более обильные (1', 2' и 4') и два менее обильные (0', 3'). Локализация этих транскриптов в пределах TR (как показано на рис. 34.1) была подтверждена гибридизацией ^{32}P -меченой кДНК (полученной путем обратной транскрипции РНК 1GV7 с помощью затравки олиго-dТ) с *Hinf*I-расщепленной TR-ДНК (данные не представлены).

Полярность транскрипции

Полярность TR-транскриптов определяли гибридизацией меченых полиА⁺РНК с однонитевыми фрагментами ДНК области TR. Специфические однонитевые фрагменты ДНК известной полярности получали отжигом денатурированных двунитевых фрагментов ДНК из TR-области в присутствии избытка однонитевой ДНК бактериофага fd, содержащей TR-ДНК известной ориентации.

Одна из двух цепей двунитевого фрагмента ДНК гибридизовалась с избытком фаговой ДНК, и получившиеся в результате небольшие TR-специфичные одноцепочечные фрагменты ДНК электрофоретически отделялись от гораздо больших фрагментов

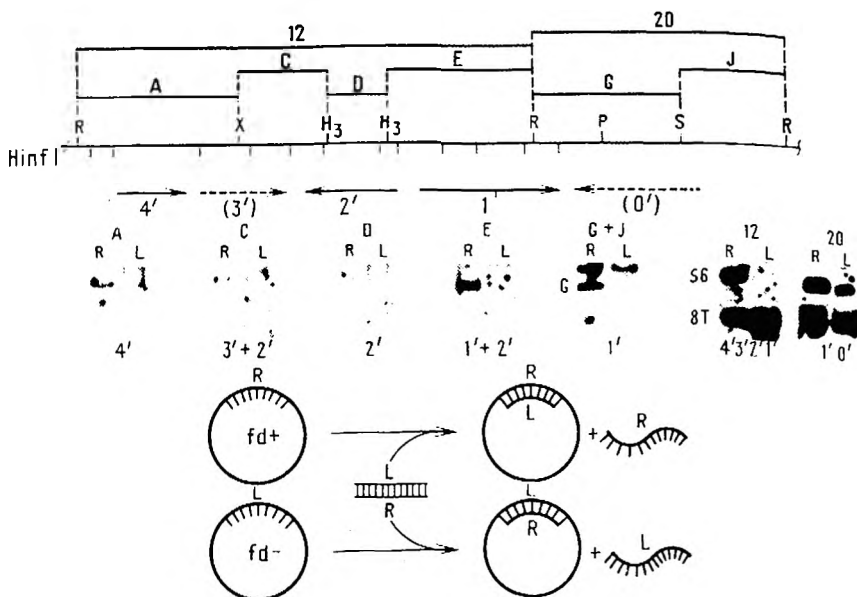


Рис. 34.2. Полярность транскрипции Т-ДНК. Одноцепочечную ДНК указанных рестриктов (А—J) получали отжигом денатурированных фрагментов с одноцепочечной ДНК бактериофага fd, содержащей Т-ДНК в известной ориентации (см. текст и схему). ПолиА+РНК из опухолевой линии 1GV7 радиоактивно метили $\alpha^{32}\text{P}$ -АТФ с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и гибридизовали на нитроцеллюлозных фильтрах с электрофоретически разделенными фрагментами однонитевой ДНК. (На дорожках 12 и 20 показана гибридизация с интактной ДНК фага fd, несущей разные цепи *Eco*RI-фрагментов 12 и 20; фаговую ДНК гибридизовали также с меченой ДНК линии 1GV23-S6.) Полярность, приписанная небольшому транскрипту 3', основана на слабой правой гибридизации с фрагментом С, а полярность транскрипта 0' выведена исходя из наблюдаемой гибридизации с левой нитью *Eco*-RI-фрагмента 20. Гибридизационные полосы, видимые иногда на обеих дорожках R и L, обусловлены остаточной примесью двунитевых фрагментов (дорожки С и G).

[теперь уже частично двунитевой ДНК fd (см. схему на рис. 34.2)]. После вырезания из геля большой полосы фаговой ДНК оставшиеся небольшие фрагменты переносили на нитроцеллюлозную бумагу. Одноцепочечные фрагменты TR-ДНК затем гибридизовали с опухолевой РНК, меченной с помощью нуклеотидкиназы. Полученные результаты (рис. 34.2) показывают, что все выявленные TR-транскрипты, за исключением 2' и 0', ориентированы от 5' к 3', направо, т. е. от TL-области.

TR-ОБЛАСТЬ И АГРОПИНОВЫЙ ФЕНОТИП

Выражение Т-ДНК в растительной ткани связано с двумя основными фенотипами: 1) вирулентностью (или способностью индуцировать и поддерживать рост опухоли) и 2) синтезом опинов

[конкретный класс (или классы) синтезируемых опинов зависит от типа Ti-плазмиды инфицирующих клеток *A. tumefaciens*]. TR-Область не требуется для вирулентности, так как: 1) в некоторых линиях корончатых галлов не содержится ДНК, гомологичной TR-области [1, 9], и 2) Ti-плазмиды с делециями TR-области индуцируют опухоли, неотличимые по ростовым потребностям и морфологии от опухолей, индуцируемых *Agrobacterium* с октопиновой Ti-плазмидой дикого типа ([6], Лееманс и др., *готовится к печати*). Однако опиновый фенотип (биосинтез агропина) контролируется TR-областью, о чем свидетельствуют следующие данные: 1) ткани, индуцированные бактериями, которые содержат Ti-плазмиду с делецией TR-области, не продуцируют каких-либо опинов агропинового семейства (Лееманс и др., *готовится к печати*) и 2) в случае плазмиды, у которой делетирована TL-область, а TR — осталась, опухоль не индуцируется, но происходит синтез агропина и маннопина в инфицированной раневой ткани [5].

Мы изучили эффект нескольких TR-мутаций на транскрипцию и биосинтез опинов в трансформированных тканях табака.

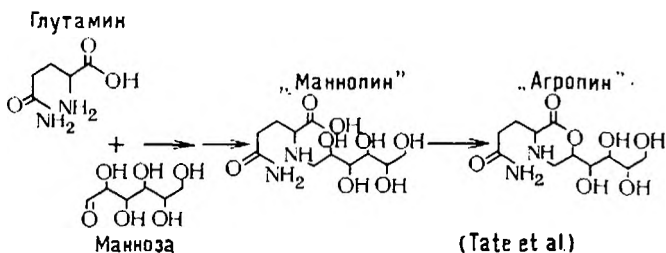
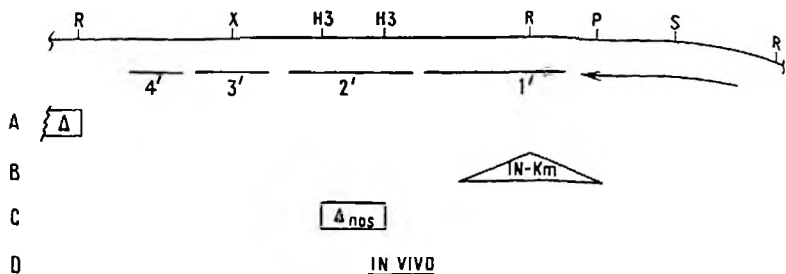
Анализ мутантов по TR-области

Несколько мутаций вблизи и в пределах TR-области было индуцировано с помощью манипуляций с ДНК Ti-плазмиды *in vitro* ([5] и *готовится к печати*). Местоположения этих мутаций относительно картированных TR-транскриптов показаны на рисунке 34.3. Опухолевые ткани, индуцированные на сорте табака Wisconsin 38 бактериями *A. tumefaciens*, содержащими такие мутантные плазмиды, выращивали в виде стерильного каллуса в аксеничных условиях и исследовали по следующим параметрам: 1) опиновому фенотипу, 2) транскрипционному профилю и 3) содержанию TR в опухолевых линиях. Аналогичным образом мы исследовали также спонтанно возникшую вариантную линию клеток, обнаруженную при размножении суспензионной культуры опухолевой линии IGV23 (индуцированной при участии Ti-плазмиды pGV2206 [5]).

Опухолевая линия IGV7 (индуцированная плазмидой pGV2208)

В опухолевой линии IGV7, индуцированной при участии Ti-плазмиды pGV2208 (с делецией по гену октопинсинтетазы, начинающейся вблизи правой границы TL-области и захватывающей левую границу TR-области [5]), синтезировался полный набор TR-транскриптов (рис. 34.1), а также оба опиона, агропин и маннопин (рис. 34.3).

Линия IGV7, как и опухолевые линии, иницированные с участием других Ti-плазмид, мутантных по TR-области, были созданы размножением первичной опухолевой ткани и потому являются потенциальными смесями независимо трансформированных и не трансформированных растительных клеток. Вследствие гетерогенности таких неклонированных опухолевых линий анализ содержа-



	Манп	Агр	Тх
2208	+	+	0'1'2'(3')4'
2242	-	-	(0')2'(3')4'
	-	-	?
2206/S6	+	+	1'

Опины Транскрипты
 В А D А В А D

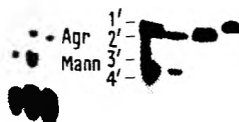


Рис. 34.3. Мутации в TR-области: фенотип и транскрипция. Мутации в TR-ДНК плазмиды рТiВ6S3 индуцировали включением *in vitro* транспозона Тn903, определяющего устойчивость к канамицину, в рGV2242 (линия В) или удалением небольшого *Hind*III-фрагмента и заменой его на ген нопалинсинтетазы плазмиды рТiС58 в рGV2253 (линия С). В линии D (1GV23-S6) мутация возникла спонтанно при размножении клеток линии 1GV23 в суспензионной культуре. TR-Транскрипты в линиях А, В и D определены с помощью РНК-блоттинга полиА+РНК. Ткани тестировали на присутствие агропина и маннопина, как описано в [8]. Структура опинов и путь их биосинтеза изображены по Тэйту и др. [7] и Эллису (личное сообщение).

шейся в них Т-ДНК затруднителен. Поэтому мы сосредоточили внимание на том, какие части TR-ДНК, определенные с помощью соответствующих рестрикционных фрагментов, присутствуют в опухолевых линиях. Гибридизационный анализ опухолевой ДНК из клеток линии 1GV7 показал, как и ожидалось, присутствие TR-ДНК, перекрывающей весь участок транскрипции TR (рис. 34.4). Следует отметить, что рестрикционные фрагменты, фланкирующие

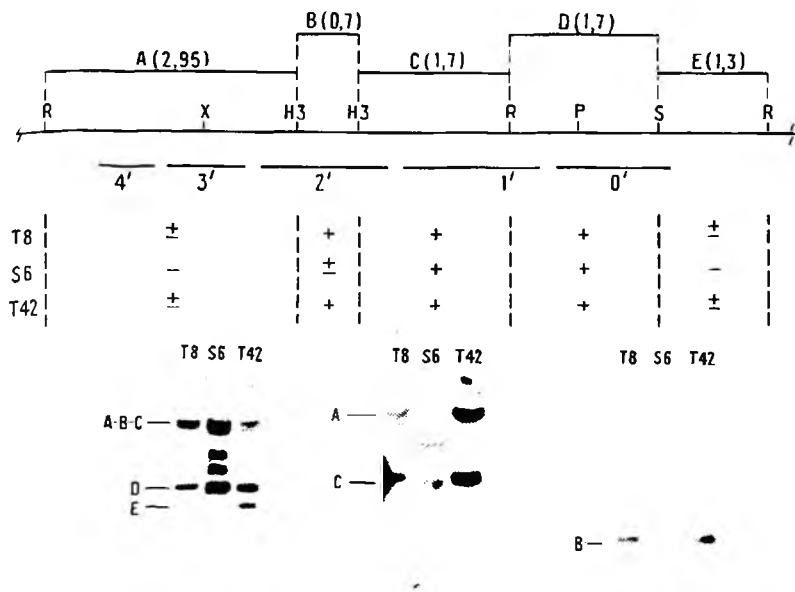


Рис. 34.4. Содержание TR-ДНК в опухолевых линиях. Содержание TR-ДНК в линиях 1GV23-S6 (S6), 1GV7 (T8) и 1GV69 (T42) определяли гибридизацией меченых фрагментов TR-ДНК (A—E) с электрофоретически разделенными и фиксированными на нитроцеллюлозе рестриктами опухолевой ДНК. Используются следующие рестрикты и меченые пробы:

слева — ДНК опухоли, расщепленную под действием *EcoRI* и *SalI*, гибридизовали с пробным меченым *BatNI*-фрагментом 2 (охватывающим всю TR-область; см. рис. 34.1); в середине — ДНК опухоли, расщепленную под действием *EcoRI* и *HindIII*, гибридизовали с пробным *EcoRI*-фрагментом, охватывающим сегменты A, B и C; 3) справа — *HindIII*-расщепленную опухолевую ДНК гибридизовали с меченым сегментом B. Присутствие фрагментов TR-ДНК в клетках каждой линии указано знаками: «+», если фрагмент содержится в количестве, сравнимом с внутренними стандартами — фрагментами C или D; «±», если фрагмент содержится в меньшем количестве, чем C или D; «-», если фрагмент не обнаружен.

TR-область (рис. 34.4, фрагменты A и E), обнаруживали не в стехиометрических количествах относительно внутренних фрагментов (рис. 34.4, фрагменты B, C и D), что указывает на разнообразие мест встраивания или поддержания TR в таких линиях клеток.

Опухолевая линия 1GV69 (индуцированная плазмидой pGV2242)

Опухолевая линия 1GV69 была индуцирована агробактериями, содержащими мутантную Ti-плазмиду pGV2242, которая получена путем встраивания рестрикционного фрагмента, кодирующего детерминанту устойчивости к канамицину Tn903, в *EcoRI*-сайт между *EcoRI*-фрагментами 12 и 20 (рис. 34.2) (Лееманс и др., готовится к печати). Вставка в этот сайт TR-области должна вызывать разрыв кодирующего участка для транскрипта 1', и, как видно из рисунка 34.1, полоса РНК 1,6 т. н. у этой опухолевой линии

значительно ослаблена. Утрата транскрипта 1' была подтверждена блоттинг-гибридизацией меченой кДНК из линии 1GV69 с TR-ДНК по Саузерну (данные не представлены). Потеря транскрипта 1' не была следствием отсутствия соответствующей TR-ДНК, поскольку установлено, что линия 1GV69 содержит фрагменты ДНК всей TR-области (рис. 34.4). Две независимо полученные опухолевые линии, индуцированные с участием плазмиды pGV2242 (1GV68 и 1GV69), продуцируют небольшие количества соединения, близкородственного, но не идентичного маннопину, которое мигрирует вместе с маннопином в применявшейся электрофоретической системе (см. рис. 34.3).

Опухолевая ткань, индуцированная плазмидой pGV2253

Анализировали первичную опухолевую ткань, индуцированную бактериями, несущими плазмиду pGV2253. TR-Мутация в этой плазмиде вызвана встраиванием рестрикционного фрагмента, кодирующего ген нопалинсинтетазы (*nos*) (из нопалиновой Ti-плазмиды pTiC58), вместо *Hind*III-фрагмента, находящегося внутри *Eco*RI-фрагмента 12 (см. рис. 34.3). Этим преследовались две цели: 1) прервать и удалить часть кодирующего участка для транскрипта 2' и 2) получить тест-маркер, чтобы судить о присутствии в инфицированной ткани Ti-области по выражению гена нопалинсинтетазы. В настоящее время для анализа имеется лишь первичная (нестерильная) опухолевая ткань, которая поэтому исследовалась лишь по признаку синтеза опинов.

В этой ткани обнаружен нопалин (что свидетельствует о присутствии в трансформированной растительной ткани гена *nos*, встроенного в TR-область), однако ни агропина, ни маннопина найдено не было. Для окончательных выводов необходим дальнейший анализ транскрипции TR и содержания Т-ДНК в клетках данной опухолевой линии; однако ясно, что удаление гена, кодирующего транскрипт 2', приводит к прекращению синтеза как агропина, так и маннопина.

Суспензионная культура линии 1GV23-S6

Линия 1GV23-S6 возникла спонтанно при размножении суспензионной культуры 1GV23. Эта исходная опухолевая линия образовалась в результате инфекции бактериями, несущими плазмиду pGV2206, которая содержит TR-область дикого типа [5]. Установлено, что в линии 1GV23-S6 образуется транскрипт 1' (рис. 34.3), примерно в таких же количествах, как и в других изучавшихся тканях, но каких-либо других TR-специфичных транскриптов обнаружено не было.

Соответственно TR-ДНК клеток рассматриваемой линии содержит участок 1'-транскрипта (фрагменты С и D, рис. 34.4); количество ДНК этого участка примерно такое же, как и в других

Гомология с pRI 15834

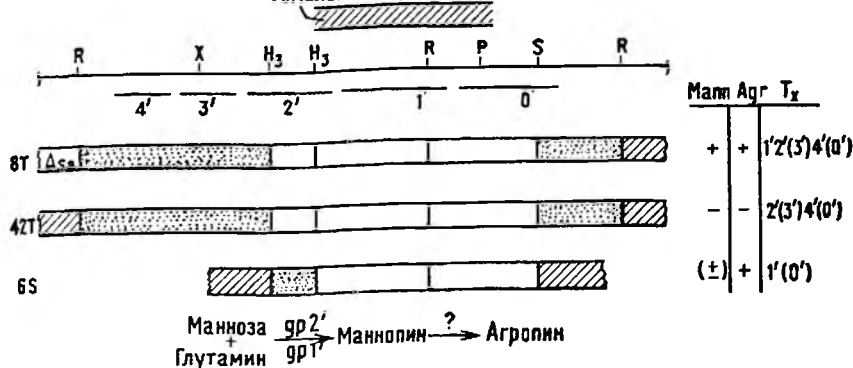


Рис. 34.5. Сравнение проанализированных мутантных линий. Указаны участки TR-области, содержащиеся в опухолевых линиях 1GV23-S6 (S6), 1GV7 (8T) и 1GV69 (42T), а также их опиновые фенотипы и TR-транскрипты. Выделенные точками фрагменты обнаружены в опухолевой ткани в небольших количествах. Заштрихованные фрагменты не были обнаружены в виде интактных рестриктов. Над рестрикционной картой указан участок частичной гомологии с плазмидой корневиндуцирующего штамма *A. rhizogenes* 15834 [11]. Внизу карты показана схема возможного пути синтеза агропина с участием генных продуктов 1'- и 2'-кодирующих участков (см. «Обсуждение»).

анализированных опухолевых линиях (рис. 34.4), тогда как фрагменты ДНК, кодирующие остальные TR-транскрипты (фрагменты А и В, рис. 34.4), были обнаружены только после продолжительной экспозиции в количествах, значительно меньших, чем для участка 1' (данные не представлены). Можно предположить, что при разноможении линии 1GV23 клетки, содержащие частично делетированную TR-область, имели селекционное преимущество перед клетками, несущими нормальную область TR. Возникшая в итоге суспензионная культура 1GV23-S6 содержит преимущественно правую часть TR (см. 6S на рис. 34.5), а левая часть этой области представлена в малых количествах. Опиновый фенотип этой культуры оказался агропин-позитивным, без следов синтеза маннопина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, изложенные в данной статье, в основном касаются двух вопросов: 1) картирования транскриптов TR-ДНК опухолевых тканей, индуцированных *A. tumefaciens*, и 2) идентификации гена или генов, расположенных в TR-области, ответственных за синтез опинов в трансформированной ткани. Получены достаточно полные данные по транскрипционному картированию, которые превосходно согласуются с независимо построенной картой (С. Гелвин в данном сборнике). Для идентификации генов, вовлеченных в биосинтез агропина/маннопина, необходим дальнейший анализ тканей, содержащих мутантную TR-ДНК, который сейчас

ведется. Здесь мы ограничимся обсуждением тех опиновых генов TR-области, которые контролируют образование агропина, а также предполагаемых этапов цепи биосинтеза агропина.

Транскрипция TR-области в растительных клетках

Установленная транскрипционная карта TR-ДНК изображена на рисунке 34.2. Пять обнаруженных транскриптов комплементарны ДНК, охватывающей большую часть TR-области.

Т-ДНК-Специфичная транскрипция была обнаружена только в двух *EcoRI*-фрагментах 12 и 20 [10], показанных на рисунке 34.2. Наличие активной экспрессии лишь у части меньшего из этих двух *EcoRI*-фрагментов (транскрипты 1' и 0' *EcoRI*-фрагмента 20) согласуется с ранее опубликованными данными о протяженности TR-области. Интактный фрагмент *EcoRI* 20 не встречается в некоторых опухолевых линиях, индуцированных с участием Ti-плазмид [1, 9]; следовательно, крайняя правая часть этого фрагмента не всегда встраивается в геном растения или же не всегда стабильно поддерживается в нем. Содержание TR-ДНК в проанализированных нами опухолевых линиях подтверждает этот вывод, поскольку крайняя правая часть рассматриваемого фрагмента (фрагмент E, рис. 34.4) присутствует в обследованных опухолевых линиях в количествах, меньших стехиометрических. Рассматривая выражение генов фрагмента *EcoRI* 20, следует отметить, что в нем был локализован локус Arg, вовлеченный в катаболизм аргинина [3]. Функция Arg является звеном в цепи распада опинов у бактерий [2] и поэтому не обязательно должна быть закодирована в Т-ДНК, переносимой и экспрессируемой в трансформированной растительной ткани. Весьма вероятно, что Arg-локус включает хотя бы часть нетранскрибируемого (в наших опухолевых линиях) крайнего правого участка фрагмента *EcoRI* 20.

Гены, контролирующие биосинтез агропина

Изложенные в настоящей статье данные свидетельствуют о том, что в контроле синтеза опинов в трансформированной ткани участвует не менее двух транскрибируемых TR-участков, кодирующих транскрипты 1' и 2'. Роль белкового продукта участка, кодирующего транскрипт 2', в образовании агропина следует из неспособности плазмиды pGV2253, у которой deletирована часть 2'-участка, индуцировать синтез агропина или маннопина в первичных опухолях. Утрата позитивного агропин-маннопинового фенотипа наблюдалась также у опухолей, индуцированных Ti-плазмидой, которая содержит вставку транспозона в 2'-участке (*неопубликованные данные*).

Инактивация 1'-кодирующего участка вставкой в Ti-плазмиде pGV2242 приводит к маннопин- и агропин-негативному фенотипу трансформированных тканей. В таких тканях, однако, образуется незначительное количество соединения, которое, хотя и мигрирует вместе с маннопином в использованной электрофоретической сис-

теме, но не идентично ему (Дж. Эллис, *личное сообщение*). Маловероятно, что это соединение — предшественник одного или нескольких опинов агропинового типа.

Было установлено также, что 1'-кодирующий участок частично гомологичен (см. рис. 34.5) Ri-плазмиде (индуцирующей корнеобразование) штамма *A. rhizogenes* 15834, возбудителя болезни бородачатые корни. Поскольку корневые ткани, трансформированные Ri-плазмидой 15834, также продуцируют агропин и маннопин [11], то вполне вероятно, что область rRi15834, отчасти гомологичная 1'-кодирующему участку TR-области, тоже вовлечена в образование агропина. На уровне жесткости условий гибридизации в наших опытах не выявлено гомологии каких-либо других частей TR-ДНК с rRi15834. Наконец, в опухоловой линии 1GV23-S6, в которой среди TR-специфичных транскриптов обнаружены лишь 1'- и 0'-транскрипты, найдены небольшие количества агропина, но не маннопина. Линия 1GV23-S6 содержит, однако, небольшое количество TR-ДНК, кодирующей 2'-, 3'- и 4'-транскрипты. Поскольку инактивация 2'-кодирующего участка выключает синтез маннопина и агропина, представляется вероятным, что в опухоли 1GV23-6S 2'-кодирующий участок транскрибируется, но на необнаружимо низком уровне. Для проверки этой возможности сейчас ведутся исследования с помощью более чувствительных методов. Во всяком случае присутствие относительного избытка 1'- и 0'-транскриптов связано с возрастанием доли агропина в тканях рассматриваемой опухоли.

Пока что у нас нет данных о продуктах 3'- и 4'-кодирующих участков. В настоящее время мы индуцируем мутации, затрагивающие эти локусы TR-области.

Путь биосинтеза маннопина и агропина, показанный на рисунке 34.3, предложен Тэйтом и др. [7] на основании: 1) структуры опинов и 2) аналогии с анаболическими путями октопина и нопалина. Пока еще нет прямых биохимических данных, подтверждающих предложенный путь биосинтеза. Наши результаты согласуются с двухступенчатым путем, в котором не менее двух кодирующих участков TR-области вовлечены в биосинтез агропина; мутированный 2'-участок содержится в плазмиде rGV2253 и мутированный 1'-участок — в плазмиде rGV2242. Эти результаты лучше всего согласуются с предложенным путем в случае, если для конденсации глутамина и маннозы при образовании маннопина необходимы оба участка — 1' и 2'. Фермент, ответственный за циклизацию маннопина при образовании агропина, может кодироваться либо геном растения, либо одним из остающихся TR-генов. Разумеется, нельзя исключить существования независимых биосинтетических путей для каждого из этих опинов, а также более сложных моделей, включающих функции транспорта опинов.

Хотя наши данные в основных чертах согласуются с предложенным путем биосинтеза агропина, некоторые его стороны требуют дальнейшего изучения. Это относится к анализу суспензионной культуры 1GV23-S6. Уровень чувствительности, достигнутый

в наших опытах, позволил выявить в этой линии лишь 1'- и 0'-транскрипты, хотя она способна синтезировать сравнительно большое количество агропина. Этот факт противоречит наблюдению, что для синтеза маннопина и агропина в клетках данной линии транскрипция 2'-участка происходит на уровне, недостаточном для его обнаружения. Как упоминалось выше, транскрипцию 2'-участка исключить нельзя, так как в этой линии присутствует TR-ДНК с 2'-участком, хотя и в очень малом количестве. Возможность транскрипции 2'-участка TR-области указывает на гомологию с плазмидой pRi15834, поскольку в синтезе агропина участвуют, по крайней мере, 1'- и 2'-участки. Сравнение систем биосинтеза агропина *A. rhizogenes* и октопиновых Ti-плазмид представляет большой интерес для выяснения происхождения и эволюции опиновых генов у агробактерий.

В настоящее время мы завершаем анализ рассматриваемых мутантных линий, а также некоторых новых TR-мутантов. Полученные данные помогут выяснить функции TR-генов, экспрессируемых в растительных тканях.

ДОБАВЛЕНИЕ

Опин, присутствующий в следовых количествах в клетках линий 1GV68 и 1GV69 (индуцированных плазмидой pGV2242), который мигрирует вместе с маннопином, как выяснилось впоследствии, является промежуточным продуктом пути синтеза маннопина (Дж. Эллис и М. Тэйт, *личное сообщение*). Таким образом, у TR-мутанта, у которого отсутствует 1'-транскрипт, по-видимому, блокирована вторая реакция, ведущая к образованию маннопина. Этот факт вместе с предварительными генетическими данными о роли 0'-участка в синтезе агропина указывает на трехступенчатый биосинтетический путь. Следовательно, для образования агропина необходимы продукты 0'-, 1'- и 2'-транскриптов.

Благодарности. Мы благодарим Барбару Бейкер за критические замечания в ходе подготовки рукописи и Э. Шельцель за высококачественную машинописную обработку рукописи. При выполнении данной работы И. Вельтен был стипендиатом ЕМВО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall. *Mol Gen Genet* 183:283—288
2. Ellis JG, Kerr A, Tempé J, Petit A (1979) Arginine catabolism: a new function of both octopine and nopaline Ti-plasmids of *Agrobacterium*. *Mol Gen Genet* 173:263—269
3. Greve H De, Decraemer H, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1981) The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6S3. *Plasmid* 6:235—248
4. Guyon P, Chilton M-D, Petit A, Tempé J (1980) Agropine in "null type" crown gall tumors: evidence for the generality of the opine concept. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2693—2697

5. Leemans J, Sham C, Deblaere R, Greve H De, Hernalsteens JP, Maes M, Montagu M Van, Schell J (1981) Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium* Ti plasmids and transfer of genes to plant cells. *J Mol Appl Genet* 1:149—164
6. Ooms G, Hooykaas PJJ, Veen RJM Van, Beelen P Van, Regensburg-Tuink TJG, Schilperoort RA (1982) Octopine Ti plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7:15—29
7. Tate ME, Ellis JG, Kerr A, Tempè J, Murray K, Shaw K (1982) Agropine: a revised structure. *Carbohydr Res* (in press)
8. Tepfer DA, Tempè J (1981) Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. *C R Acad Sci (Paris)* 292 Ser III:153—156
9. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organisation of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19:729—739
10. Vos G De, Beuckeleer M De, Montagu M Van, Schell J (1981) Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor inducing pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid* 6:249—253
11. Willmitzer L, Simon G, Schell J (1982) The TL-DNA in octopine crown-gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J* 1:139—146

35. ТРАНСКРИПЦИЯ Т-ДНК В КОРОНЧАТЫХ ГАЛЛАХ ОКТОПИНОВОГО И НОПАЛИНОВОГО ТИПА

Л. ВИЛЬМИТЦЕР*, П. ДЭЗЕ**, П. ШРАЙЕР*,
М. ВАН МОНТЕГЮ** и ДЖ. ШЕЛЛ*,**

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярный механизм, лежащий в основе опухолеродной трансформации растительных клеток в клетки корончатого галла, включает перенос и стабильную интеграцию Т-области — определенного сегмента Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* — в ядерный геном клеток растения (см. обзор [12]). Корончатые галлы октопинового и нопалинового типа относятся к наиболее изученным опухолям. Если в нопалиновых опухолях Т-ДНК состоит из непрерывной последовательности ДНК размером около 26 т. п. н. [11], то Т-ДНК октопиновых опухолей может включать один или два фрагмента соседних последовательностей Ti-плазмиды. Все изучавшиеся до настоящего времени октопиновые опухолевые линии содержат фрагмент, расположенный на карте Ti-плазмиды слева (и потому называемый TL-ДНК), тогда как фрагмент, лежащий справа (и потому называемый TR-ДНК), присутствует лишь в некоторых линиях ([1, 15], Вельтен и др. в данном сборнике). В октопиновых и нопалиновых Ti-плазмидах имеется несколько участков гомологии. К ним относится сегмент, присутствующий в Т-ДНК всех нопалиновых опухолей [4]. Поэтому предполагается, что эта, так называемая общая, ДНК играет важную роль в формировании и поддержании октопиновых и нопалиновых опухолей.

Для выяснения механизма опухолеродной трансформации наша группа использовала два подхода. С одной стороны, в специфических сайтах Т-области октопиновых и нопалиновых Ti-плазмид были осуществлены инсерционные и делеционные мутации ([8, 9], Лееманс и др. в данном сборнике).

С другой стороны, проведено тщательное определение числа, размеров и локализации различных генов, закодированных в Т-ДНК, путем анализа полиаденилированных транскриптов Т-ДНК

* L. Willmitzer, P. H. Schreier, J. Shell, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 5000 Köln 30, BRD.

** P. Dhaese, M. Van Montagu, J. Schell, Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, 9000 Gent, Belgium.

в опухолях октопинового и нопалинового типа. Результаты этого анализа описаны в данной статье. Такой комбинированный подход позволил получить довольно четкое представление о локализации и функциях разных генов, кодируемых Т-ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общий экспериментальный подход

В одном из типов экспериментов полиА⁺РНК, выделенная из опухолей в условиях, предотвращающих разрушение РНК, была электрофоретически разделена по размерам и перенесена на ди-азобензилоксиметилловую (ДБМ) бумагу. Затем на таких фильтрах транскрипты Т-ДНК гибридизовали с большим количеством пробных Т-ДНК-фрагментов, меченных до высокой удельной активности с помощью ник-трансляции. Таким способом была построена довольно точная карта закодированных в Т-ДНК полиаденилированных транскриптов. Полярность различных транскриптов определяли:

гибридизацией полиА⁺РНК, меченной по 5'-концу полинуклеотидкиназой с разделенными цепями фрагментов Т-ДНК, специфически кодирующими один или группу транскриптов, идентифицируя таким образом кодирующую цепь ДНК;

определением химической полярности этой кодирующей цепи путем гибридизации фрагментов Т-ДНК, специфически меченных по одному определенному 3'-концу концевой трансферазой.

TL-ДНК из октопиновой опухолевой линии A6-S1 табака кодирует восемь разных полиаденилированных транскриптов, отсутствующих в нетрансформированных клетках

Радиоавтографы, полученные после гибридизации клонов Т-области, содержащих всю TL-ДНК, с электрофоретически разделенной полиА⁺-фракцией РНК, изолированной из клеток октопиновой линии A6-S1 (первая дорожка) и из клеток нетрансформированной линии табака NW-S1 (вторая дорожка), показаны на рисунке 35.1.

По разнице в размерах можно легко различить семь видов РНК, причем полоса 6 распадается на две, соответствующие транскриптам 6 а и 6 б. Гибридизация с полиА⁺РНК, выделенной из нетрансформированной ткани, не наблюдается. Размеры и относительное содержание разных транскриптов значительно варьируют.

Транскрипты 3 и 7 присутствуют в наибольшей концентрации, транскрипты 4 и 6 менее обильны, и еще ниже концентрация транскриптов 1, 2 и 5.

Термины «высокая и низкая концентрации» использованы только для сравнения внутриклеточных концентраций разных транс-

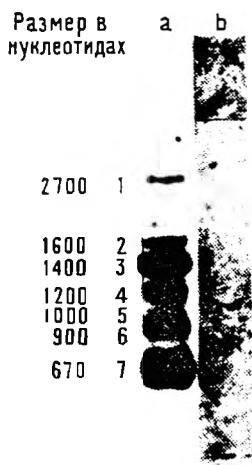


Рис. 35.1. Гибридизация октопиновой ТЛ-ДНК с полиА+РНК, выделенной из октопиновых корончатогалловых опухолей А6-S1 (левая дорожка) и их не-трансформированной ткани (правая дорожка). В качестве проб брались ник-транслированные *Hind*III-фрагмент 1 и *Bam*HI-фрагмент 8 плазмиды рTiAch5:

1—7 — транскрипты, расположенные в порядке убывания их размера; длина транскриптов указана в нуклеотидах без поправки на полиА-хвост.

в гибридизационных опытах с привлечением разных фрагментов Т-ДНК, как показано на рисунке 35.2. Сведения, относящиеся к идентификации двух транскриптов, названных 6 а и 6 б, изложены в работе [18].

Экспериментальные данные по определению полярности разных транскриптов представлены на рисунке 35.3. Так, например, в случае *Eco*RI-*Bam*HI-фрагмента е, специфичного для транскрипта 1, 5'-меченная полиА+РНК гибридизуется лишь с верхней цепью ДНК.

То же наблюдается и в случае фрагментов f и g, соответственно кодирующих транскрипты 1, 4 и 1, 4 и 6 а, когда гибридизация имеет место с верхней нитью ДНК.

Следовательно, все эти транскрипты должны обладать одной и той же полярностью.

Химическая полярность верхней цепи определена с помощью гибридизации *Eco*RI-*Kpn*I-фрагмента Y, специфически меченного по 3'-концу концевой трансферазой, с разделенными нитями *Eco*RI-фрагмента 7. Гибридизация с верхней нитью видна на рисунке 35.3 (группа d, дорожка 3), следовательно, 5'—3'-полярность транскриптов, считываемых с этой цепи, ориентирована слева направо.

Данные о размерах, локализации и полярности восьми разных транскриптов, закодированных в ТЛ-ДНК, которые присутствуют в корончатых галлах октопинового типа, суммированы на рисунке 35.4.

Все РНК картируются в пределах последовательности Т-ДНК. Этот факт, а также наблюдение, что транскрипция Т-ДНК подавляется низкими концентрациями α-аманитина [16], свидетельствует о том, что каждый транскрипт определяется специфическим промотором Т-ДНК, узнаваемым РНК-полимеразой II растения. Видно, что транскрипты распадаются на группы по несколько со-

криптов ТЛ-ДНК между собой. Все транскрипты ТЛ-ДНК принадлежат к классу малообильных макромолекул и в целом составляют не более 0,001—0,005 % всей популяции полиА+РНК [17]. Локализация транскриптов на карте Т-ДНК установлена

седних транскриптов одинаковой полярности. Простейшая модель состоит в том, что для группы транскриптов одинаковой полярности, например, таких, как 1, 4 и 6 а, имеется один общий промотор. В таком случае можно ожидать, что инактивация 5'-проксимального гена группы приведет к исчезновению транскриптов 5'-дистальных генов. Однако анализ тканей, содержащих Т-ДНК определенных мутантных Ti-плазмид, показал, что групповой инактивации генов не происходит [8, 10, 17]. Таким образом, по имеющимся пока данным, каждый ген Т-ДНК имеет свои собственные сигналы, обеспечивающие транскрипцию в эукариотической растительной клетке. В настоящее время ведутся опыты с целью использования таких промоторов в Т-ДНК для экспрессии последовательностей чужеродной ДНК в растительных клетках.

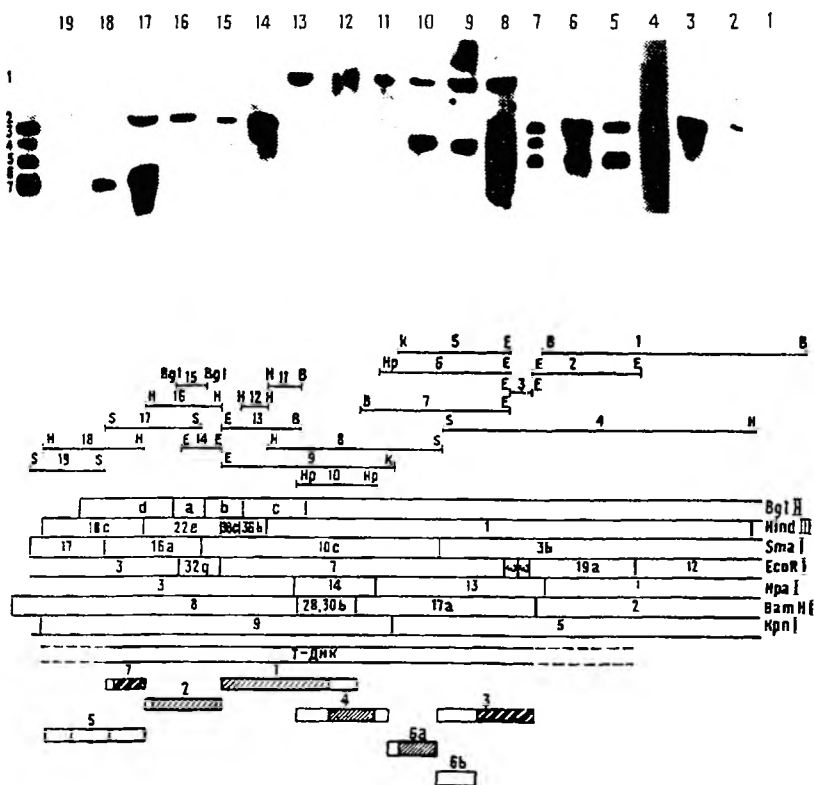


Рис. 35.2. Гибридизация проб — субфрагментов октопиновой TR-области с полиА+РНК, выделенной из октопиновой корончато-галловой опухоли А6-S1. Вверху помещены гибридизационные профили; цифры над каждой дорожкой соответствуют цифрам на карте, помещенной ниже, и обозначают фрагмент Т-ДНК, использованный в качестве пробы. Наиболее вероятное положение каждого транскрипта на карте указано внизу в виде заштрихованной части прямоугольника; границы каждого прямоугольника отражают неопределенность локализации транскрипта. Интенсивность штриховки пропорциональна относительным концентрациям транскриптов.

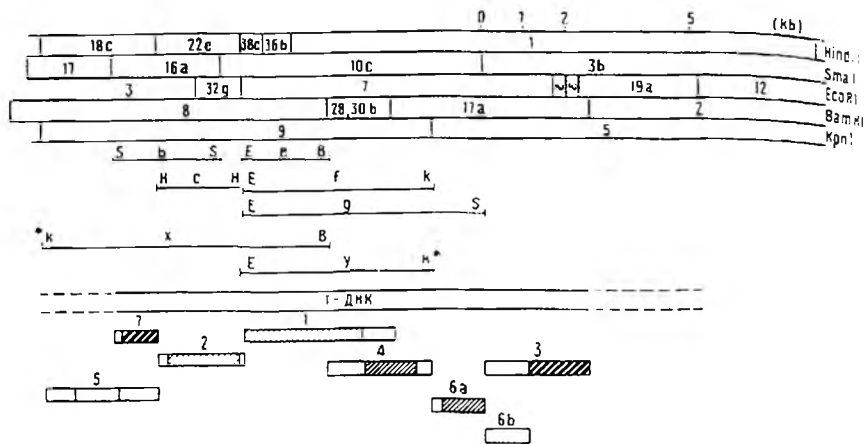
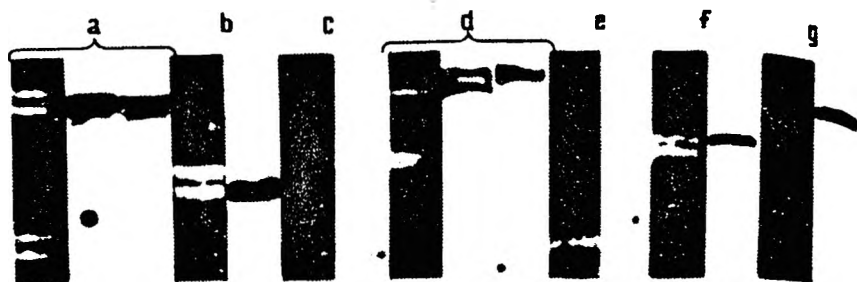


Рис. 35.3. Гибридизация полиА+РНК из октопиновой опухолевой линии А6-S1 с разделенными цепями различных фрагментов Т-ДНК. Молекулы полиА+РНК были мечены по 5'-концам полинуклеотидкиназой. Гибридизацию осуществляли со следующими фрагментами Т-области: группа *a* — *Bam*HI-фрагмент 8 (нижние полосы относятся к вектору рВR322); группы *b* и *c* — фрагменты *b*, *c*; группа *d* — *Eco*RI-фрагмент 7; группы *e*, *f*, *g* — фрагменты *e*, *f*, *g*, изображенные в нижней части рисунка. Гибридизация с полиА+РНК во всех случаях показана на второй дорожке, окрашивание разделенных цепей бромистым этидием во всех случаях показано на первой дорожке. Для групп *a* и *d* на третьей дорожке показана гибридизация фрагмента *x*, избирательно меченного на выступающем 3'-конце, возникшем в результате действия рестриктазы *Kpn*I (отмечен звездочкой). Локализация различных транскриптов, изображенная, как на рисунке 35.2, показана внизу.

Восемь транскриптов, образующихся на TL-ДНК октопиновых опухолей, можно разделить на две группы по их отношению к генам, экспрессирующимся в нопапиновых опухолях.

Первая группа включает шесть транскриптов (1, 2, 4, 5, 6 а и 6 б), кодируемых общей ДНК, которые физически и функционально родственны своим аналогам в нопапиновых опухолевых клетках. Подробнее они будут рассмотрены ниже.

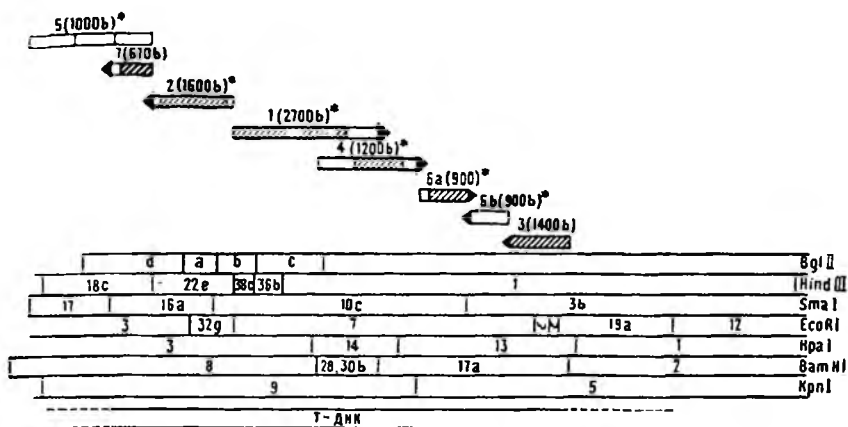


Рис. 35.4. Размеры, локализация и направление транскрипции у транскриптов октопиновой Т-ДНК. Локализация каждого транскрипта показана отдельным прямоугольником; заштрихованная часть отражает размер и наиболее вероятное местоположение транскрипта на карте (в непроверенном предположении об отсутствии сплайсинга); интенсивность штриховки пропорциональна относительной концентрации каждого транскрипта. Размеры даны в нуклеотидах без поправки на полиА-хвост. Стрелками указана полярность 5'—3'. Звездочками отмечены транскрипты «общей» ДНК.

Вторая группа, представленная транскриптами 3 и 7, специфична для опухолей октопинового типа. Что касается их функции, то генетические и биохимические данные показывают, что транскрипт 3 кодирует октопин-синтезирующий фермент [5, 9, 13, 14]. Транскрипту 7 какая-либо функция еще не приписана; для Ti-плазмиды с мутацией в этом гене не обнаружено какого-либо фенотипического проявления [5].

В этой связи следует упомянуть, что четыре транскрипта, закодированные в TR-ДНК в октопиновых опухолях (Вельтен и др. в данном сборнике), также относятся к классу октопин-специфичных опухолей.

Т-ДНК нопалиновых опухолей кодирует не менее тринадцати разных полиаденилированных транскриптов

Воспользовавшись теми же методиками, которые описаны для октопиновых опухолей, мы определили полярность, размеры и местоположения тринадцати полиаденилированных транскриптов нопалиновой Т-ДНК, которая содержится в нопалиновой корончато-галловой линии ВТ37 табака.

Полученные результаты суммированы на рисунке 35.5 (подробное описание экспериментальных данных приведено в работе [18]). Как и в случае транскриптов, кодируемых октопиновой ТЛ-ДНК, все РНК картируются в пределах Т-ДНК. Для кодирования служат обе цепи ДНК. Эти наблюдения, а также отсутствие каких-

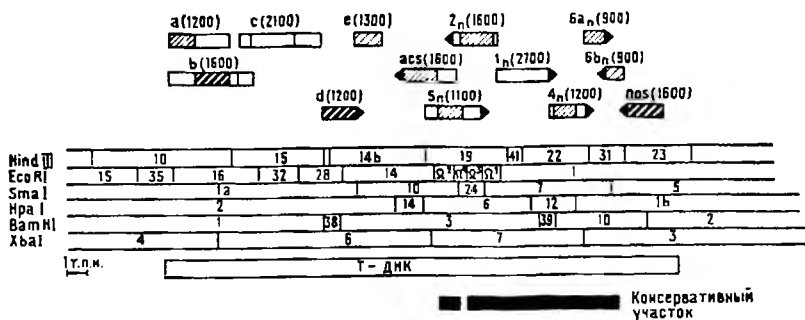


Рис. 35.5. Размеры, локализации и полярность полиаденилированных транскриптов с нопалиновой Т-ДНК. Подробности, как на рисунке 35.4. Транскрипты, закодированные в консервативной части Т-ДНК, пронумерованы в соответствии с системой нумерации, принятой для октопиновых транскриптов; индекс «п» означает «нопалиновый»:
acs — контроль синтеза агроцинопина; *nos* — контроль синтеза нопалина.

либо полярных эффектов при инактивации одного гена на выражение другого гена [8] являются веским аргументом в пользу того, что и в нопалиновых опухолях большинство (если не все) транскриптов регулируются своими собственными промоторами.

И вновь эти транскрипты можно разделить на две группы: первая группа включает семь генов (транскрипты *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *a* также гены *acs* и *nos*), специфичных для нопалиновых опухолей. Пока что известны функции лишь двух транскриптов. Ген *acs* кодирует транскрипт длиной 1600 н. и локализован слева от общей ДНК, ответственной, как установлено ранее, за синтез агроцинопина и опина [3]. Ген *nos*, также кодирующий транскрипт длиной 1600 н. и ответственный за синтез нопалина, примыкает справа к общей ДНК [8]. Функции остальных транскриптов *a*—*e* пока неизвестны.

Вторая группа содержит шесть транскриптов (*1n*, *2n*, *4n*, *5n*, *6qn*, *6bn*), считываемых с общей ДНК. Речь о них пойдет ниже.

Группа из шести транскриптов, общих для опухолей как октопинового, так и нопалинового типа

Как указано выше, РНК октопиновых и нопалиновых опухолей можно разделить на две группы. В одну из них входят РНК, специфичные для опухоли соответствующего типа и считываемые с неконсервативной части Т-ДНК, а в другую — считываемые с консервативного участка Т-ДНК, общего для октопиновых и нопалиновых опухолей.

В обоих типах опухолей найдено шесть транскриптов, синтезируемых на общей ДНК. Если у транскриптов в опухоли одного типа имеются гомологичные двойники в опухоли второго типа, они должны обладать одним и тем же размером и полярностью и считываться с соответствующих участков Т-ДНК; кроме того, они

должны обнаруживать способность к перекрестной гибридизации с Т-ДНК своего аналога.

Соответствие первым трем из названных признаков очевидно при сравнении рисунков 35.4 и 35.5. Последний признак, т. е. способность к перекрестной гибридизации, также имеет место [17, 18]. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что рассматриваемая группа транскриптов строго консервативна для опухолей октопинового и нопалинового типа. Кроме того, как показывают генетические данные, они осуществляют одни и те же функции в опухолях обоих типов. Так, инактивация транскрипта 1 или 2, или их обоих приводит к формированию опухолей, образующих побеги, а инактивация транскрипта 4 дает начало опухолям, образующим корни ([5, 8, 10], Лееманс и др. в *данном сборнике*). Остальные транскрипты, 5, 6 а и 6 в, еще не соотнесены с каким-либо определенным фенотипом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детальный физический анализ полиаденилированных РНК, считываемых с Т-ДНК в октопиновых или нопалиновых опухолях, позволил построить подробную карту генов, локализованных на Т-ДНК и экспрессируемых в опухолевых клетках растений.

В октопиновых и нопалиновых опухолях имеется набор генов, специфичных для каждого из двух типов опухолей. Единственная известная ныне функция, связанная с данной группой генов, — их участие в синтезе опинов, т. е. в синтезе октопина и агропина/маннопина в опухолях октопинового типа (см. также статью Вельтена и др. в *данном сборнике*), либо в синтезе нопалина и агроцинопина в опухолях нопалинового типа.

В опухолях обоих типов обнаружен набор из шести транскриптов, которые физически и функционально в высокой степени консервативны в обеих опухолях. Три из этих транскриптов вовлечены в нарушение нормального развития растительных клеток, т. е. в подавление формирования побегов или корней. В силу высокого консерватизма этих транскриптов в опухолях октопинового и нопалинового типа логично предположить, что они играют важную роль в индукции и поддержании опухоли.

Данные, представленные на рисунках 35.4 и 35.5, дополнительные данные по секвенированию ДНК, а также результаты опытов по S1-картированию [2, 6] свидетельствуют о том, что большинство (если не все) транскриптов Т-ДНК считываются с независимых промоторов, расположенных на Т-ДНК. Эти промоторы, или хотя бы некоторые из них, экспрессируются конститутивно [7] и могут оказаться полезными для выражения чужеродных генов в растительных клетках.

Благодарности. Авторы хотели бы поблагодарить своих коллег из лаборатории генетики Брюссельского университета и из лаборатории генетики Гентского университета за помощь и дис-

куссии. Мы признательны В. Шмаленбаху и Г. Симону за превосходную техническую помощь, оказанную в ходе проведения опытов, описанных в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall. *Mol Gen Genet* 183:283—288
2. Depicker A, Stachel S, DHaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* (in press)
3. Ellis J, Murphy PJ (1981) Four new opines from crown gall tumours—their detection and properties. *Mol Gen Genet* 181:36—43
4. Engler G, Depicker A, Maenhaut R, Villaroel-Mandiola R, Montagu M Van, Schell J (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol* 152:183—208
5. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream L, White F, Gordon M, Nester E (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
6. Greve H De, DHaese P, Seurinck J, Montagu M Van, Schell J (1982a) Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid encoded octopine synthase gene. *J Mol Appl Genet* (in press)
7. Greve H De, Leemans J, Hernalsteens J-P, Thia-Toong L, Beuckeleer M De, Willmitzer L, Otten L, Montagu M Van, Schell J (1982b) Normale and fertile plants, expressing octopine synthase, regenerate from tobacco crown galls after deletion of tumour controlling functions. *Nature* (in press)
8. Joos H, Inze D, Caplan A, Sormann M, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* (submitted)
9. Leemans J, Shaw C, Blaere R De, Greve H De, Hernalsteens JP, Maes M, Montagu M Van, Schell J (1981) Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium* Ti-plasmid and transfer of genes to plant cells. *J Mol Appl Genet* 1:149—164
10. Leemans J, Blaere R De, Willmitzer L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown gall. *EMBO J* 1:147—152
11. Lemmers M, Beuckeleer M De, Holsters M, Zambryski P, Depicker A, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1981) Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. *J Mol Biol* 144:353—376
12. Montagu M Van, Schell J (1982) The Ti-plasmids of *Agrobacterium*. In: Hofschneider PH, Goebel W (eds) *Gene cloning in organisms other than E. coli*. Current topics in microbiology and immunology, vol 96. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 237
13. Murai N, Kemp (1982) Octopine synthase mRNA isolated from sunflower crown gall callus is homologous to the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:86—90
14. Schröder J, Schröder G, Huisman H, Schilperoort RA, Schell J (1981), *FEBS Lett* 129:166—168
15. Thomashow M, Nutter R, Montoya A, Gordon M, Nester E (1980). *Cell* 19:729—739
16. Willmitzer L, Schmalenbach W, Schell J (1981) Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumours is inhibited by low concentrations of α -amanitin. *Nucleic Acids Res* 9:4801—4812
17. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982a). *EMBO J* 1:139—146
18. Willmitzer DHaese P, Schreier PH, Schmalenbach W, Montagu M Van, Schell J (1982b) Size, location and polarity of T-DNA encoded transcripts in nopaline crown gall tumours; evidence for common transcripts in both octopine and nopaline tumours. *Cell* (submitted)

36. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ Т-ДНК И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ

Я. ЛЕЕМАНС*, ДЖ. ХЕРНАЛЬСТЕНС*, Р. ДЕБЛЕР*,
Х. ДЕ ГРЕВЕ*, Л. ТИА-ТУНГ*, М. ВАН МОНТЕГЮ*,**
и ДЖ. ШЕЛЛ*,**,*

ВВЕДЕНИЕ

В ряде статей этого сборника (например, Замбриского, а также Вильмитцера и др.) изложены данные, свидетельствующие о том, что опухолеродная трансформация растительных клеток в корончатый галл является следствием переноса, интеграции и выражения в них Т-ДНК — особого участка Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*.

В корончатых галлах октопинового типа (индуцированных такими штаммами *Agrobacterium*, как А6, В6S3 или Ach5) Т-ДНК может состоять из одного или двух фрагментов соседних последовательностей Ti-плазмиды. Все исследованные до сих пор опухолевые линии содержат TL-ДНК (13 т. п. н.), тогда как TR-ДНК (7 т. п. н.) обнаруживается как дополнительная последовательность ([1, 12, 16], Вельтен и др. в данном сборнике). В клетках корончатого галла Т-ДНК транскрибируется РНК-полимеразой II хозяина с образованием набора определенного числа полиаденилированных транскриптов. TL-ДНК кодирует 8 транскриптов в различных относительных концентрациях. Поскольку для кодирования используются обе цепи ДНК, можно заключить, что в образовании этих транскриптов участвуют независимые промоторы и сайты добавления полиА на Т-ДНК. Анализ первичной структуры ДНК и картирование генов Т-ДНК с помощью нуклеазы S1, например, гена октопинсинтетазы [6] показали, что гены Т-ДНК действительно обладают участками контроля транскрипции, сходными с таковыми эукариотических генов.

«Общая» ДНК — это участок гомологичной ДНК, присутствующей в октопиновой и нопалиновой Т-ДНК [2, 3, 4]. Она кодирует транскрипты одного и того же размера и полярности в обоих типах опухолей. Эти транскрипты гибридизуются с соответствующи-

* J. Leemans¹, J. P. Hernalsteens, R. Deblaere, H. De Greve, L. Thia-Toong, M. Van Montagu, J. Schell, Laboratorium voor Genetische Virologie, Vrije Universiteit Brussel, Paardenstaat 65, 1640, St.-Genesius-Rode, Belgium.

** Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, 900 Gent, Belgium.

*** Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, 5000 Köln 30, BRD.

¹ Present address: Centro de investigaciones sobre fijación de nitrógeno, Ap. Postal 565. A, Cuernavaca, Mexico.

ми участками общей ДНК октопиновой и нопалиновой Т-ДНК. Предполагается, что общая ДНК, а следовательно, и общие транскрипты играют ключевую роль в формировании и поддержании опухолей [3].

В настоящей статье мы опишем генетическую идентификацию функций, закодированных в Т-ДНК. Методы, разработанные для этого анализа, и его результаты имеют решающее значение для использования Т-ДНК в качестве экспериментального генного вектора для растений. Действительно, разработаны эффективные методы клонирования в Тi-плазмиды, позволяющие расчлнить процессы переноса Т-ДНК и роста опухоли, что привело к регенерации нормальных фертильных растений, сохраняющих последовательности Т-ДНК.

ЭФФЕКТИВНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ В Т-ДНК И САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ Тi-ПЛАЗМИД

Характер генетической организации и большой размер Тi-плазмид не позволяют конструировать малые Тi-плазмиды, непосредственно пригодные в качестве клонирующих векторов. Было испытано несколько альтернативных подходов, включающих клонирование или мутагенез в так называемых промежуточных векторах, которые содержат изолированные Тi-фрагменты. Сайт-направленные вставки в Тi-плазмиды осуществляли путем замены последовательностей дикого типа на модифицированные Тi-

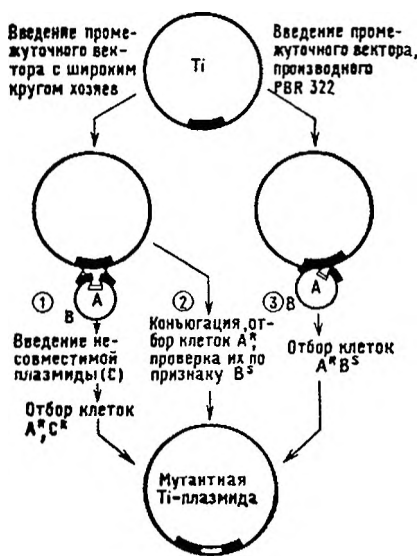


Рис. 36.1. Сайт-направленный мутагенез Тi-плазмид. Схема трех разных подходов для выделения мутантных Тi-плазмид с помощью гомологичной рекомбинации между рТi и промежуточными векторами. Гомологичная ДНК показана жирной линией. Маркеры устойчивости к антибиотикам обозначены А и В. Подходы 1 [14] и 2 [10] основаны на клонирующих векторах, которые реплицируются в агробактериях. Желаемые рекомбинанты можно получить, либо элиминируя промежуточный вектор путем исцеления от него с помощью несовместимой плазмиды, несущей антибиотиковый маркер C^R (подход 1), либо путем конъюгации и отбора трансконъюгантов, устойчивых к антибиотику А, но чувствительных к антибиотику В (подход 2). Прямая мобилизация производных плазмиды рВВ322 дает одновременно и коинтеграаты (единичные кроссоверы), и мутантные Тi-плазмиды (двойные кроссоверы) (подход 3). Проведение проверки на содержание клеток B^S сразу после отбора колоний A^R дает мутантную Тi-плазмиду.

последовательности в процессе рекомбинации *in vivo* между промежуточным вектором и находящейся в клетках Ti-плазмидой. Три применявшихся подхода в общих чертах изображены на рисунке 36.1. В первых двух были использованы промежуточные векторы широкого круга хозяев, которые стабильно реплицируются в *Agrobacterium* [10, 14]. В третьем, наиболее полезном, методе [8] использованы промежуточные векторы, производные плазмиды pBR322. Их можно эффективно мобилизовать в *Agrobacterium*, но они не способны реплицироваться в этом хозяине. Поскольку такие векторы содержат Ti-плазмидные последовательности, они могут сохраниться за счет рекомбинации *in vivo* с Ti-плазмидой. Если произойдет два акта рекомбинации, то наблюдается выщепление варианта плазмиды pBR322, содержащего Ti-последовательность дикого типа, который впоследствии и теряется. В результате остается желаемая рекомбинантная Ti-плаزمиды.

ФУНКЦИИ ГЕНОВ Т-ДНК

Проведен детальный мутационный анализ Т-области октопиновой и нопалиновой Ti-плазмид с применением трех методов описанных в предыдущем разделе. Использовались две стратегии.

Сайт-направленный транспозонный мутагенез

С помощью транспозонного мутагенеза достигнуто почти полное насыщение октопиновой [5] и нопалиновой Т-ДНК [9] вставками Tn5 и Tn3. Это позволило идентифицировать участки Т-ДНК,



Рис. 36.2. Гомологичные участки ДНК Т-области октопиновой плазмиды pTiAc5b и нопалиновой плазмиды pTiC58, называемые общей ДНК [4]. Указана относительная протяженность октопиновой TL- и TR-ДНК, а также нопалиновой Т-ДНК в большинстве изученных опухолевых линий [1, 12, 16]. Направление, размер и локализация восьми транскриптов TL-ДНК взяты из работ Вильмитцера и др. [17, 18], за исключением направления транскрипта 5, которое выведено из данных по секвенированию ДНК. Транскрипты пронумерованы в порядке уменьшения размера 1—7. Шесть из восьми транскриптов считываются с последовательностей общей ДНК. Указаны их гомологи в нопалиновых опухолях. Ti-Плазмиды, мутированные по транскриптам 1 или 2, стимулируют образование побегов, а мутированные по транскрипту 4 — образование корней. TL-Транскрипт 3 кодирует октопинсинтетазу. Указаны также закодированные в нопалиновой Т-ДНК гены *acs* и *nos* (агropинсинтаза и нопалинсинтаза соответственно).

вовлеченные в синтез октопина, нопалина и агроцинопина (рис. 36.2).

Эти участки не входят в общую ДНК. Мутации, введенные в общую ДНК, индуцируют три разных фенотипа:

- 1) опухоли, которые индуцируют образование побегов (мутации в транскриптах 1 или 2);
- 2) опухоли, которые индуцируют образование корней (мутации в транскрипте 4);
- 3) опухоли без аберрантного фенотипа.

Сайт-специфичный делеционный и заместительный мутагенез

Благодаря наличию физических карт Т-ДНК, построенных с применением различных рестриктирующих ферментов, можно получать *in vitro* серии мутантных Ti-плазмид с определенными делециями в Т-области, приводящими к потере одного или более известных транскриптов Т-ДНК. Такой подход позволяет создавать почти любые комбинации набора этих транскриптов. Изучение свойств тканей, полученных из растений или растительных протопластов, инфицированных такими мутантными штаммами, и анализ транскриптов Т-ДНК в мутантных линиях корончатого галла дали дополнительные сведения о генетической организации Т-ДНК:

1. Продукты, кодируемые транскриптами 1, 2 и 4, действуют, подавляя развитие органов как из трансформированных, так и не содержащих Т-ДНК клеток. Подавляющее большинство нормальных растений, регенерированных из опухолей, индуцированных *in vivo* мутантами, которые стимулируют образование побегов, не синтезируют опины. Наиболее вероятно, что эти побеги возникают из нетрансформированных клеток, присутствующих в опухоли, или из клеток, в которых Т-ДНК в значительной мере или полностью делетирована. Клонированные опухолевые линии, полученные путем инфекции протопластов табака индуцирующими побеги агробактериями, образуют только трансформированные тератомы. Это означает, что транскрипт 1 и (или) 2 подавляет (или подавляют) регенерацию побегов как из трансформированных, так и из нетрансформированных клеток путем образования способных к диффузии гормоноподобных веществ. Аналогичные аргументы справедливы для продукта транскрипта 4, предотвращающего регенерацию корней.

2. Некоторые мутанты по правой части Т-ДНК индуцируют опухоли большего размера, чем дикий тип [5]. Это указывает на то, что, помимо транскриптов 1, 2 и 4, в поддержание опухолевого состояния вовлечены и другие гены Т-ДНК (6 а или 6 б). Мы построили эписому рGV2235 — двойной мутант, в котором наряду с транскриптом 6 б инактивированы транскрипты 5, 7, 2 и 1 (рис. 36.3).

По сравнению с рGV2219 — соответствующим мутантом, в котором транскрипт 6 б присутствует, — рGV2235 индуцирует на

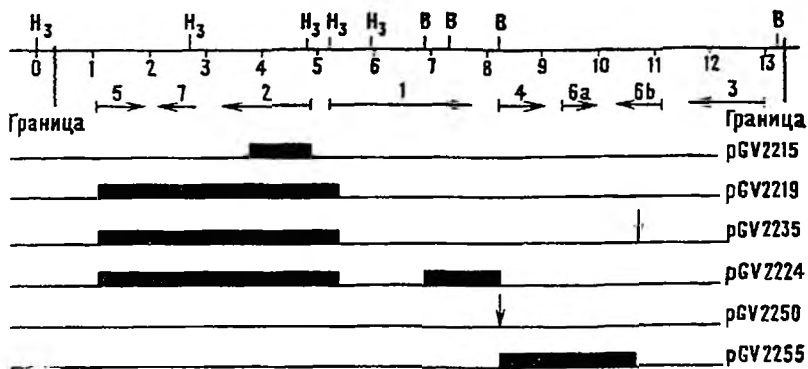


Рис. 36.3. Положение мутаций в TL-участке октопиновой плазмиды pTiB6S3 на физической карте T-области, построенной с помощью рестриктаз *HindIII* (H_3) и *BamHI* (B). Положение транскриптов (1—7) указано по данным Вильмитцера и др. [17, 18]. Стрелками обозначены вставки, а жирными линиями — делеции (в pGV2219) или замещения в pGV2215. Плазмиды pGV2219 и pGV2235 индуцируют опухоли, образующие побеги; pGV2224 авирулентна, а pGV2250 и pGV2255 индуцируют опухоли, образующие корни.

табаке опухоли меньшего размера при повышенной стимуляции образования побегов.

На декапитированных томатах сорта *Margmande* pGV2219 индуцировала опухоли, из которых иногда вырастали побеги. Напротив, pGV2235 стимулирует рост большого числа нетрансформированных побегов у всех инокулированных растений томатов задолго до появления опухолевой ткани (рис. 36.4). Эти побеги хорошо укореняются и вырастают до зрелого состояния без пассирования через тканевую культуру. Хозяйственно ценные сорта томатов, включая использованный нами, особенно трудно поддаются регенерации в культуре ткани. На основании полученных результатов можно предположить, что pGV2235 и подобные плазмиды представляют собой новый и перспективный инструмент для регенерации. Например, они могут расширить возможности отбора растений с измененными свойствами посредством соматической изменчивости [15] для видов растений, которые пока не поддаются регенерации в тканевой культуре.

3. Данные, полученные с помощью транспозонного мутагена, показывают, что ни одна из единичных вставок в T-области не приводит к полной потере онкогенности [5, 9]. С помощью делеционных мутантов этот вывод был подтвержден и уточнен; в опухолях, возникших при участии pGV2235 (рис. 36.3) — побегоиндуцирующей октопиновой Ti-плазмиды — наряду с транскриптом 3, кодирующим октопинсинтеазу, образуются лишь транскрипты 4 и 6 а. Напротив, в корнеиндуцирующих опухолях, возникших при участии таких плазмид, как pGV2255 и pGV2258 (рис. 36.3), транскрипты 4 и 6 а отсутствуют.



Рис. 36.4. Образование побегов на опухоли томата, индуцированной с участием плазмиды рGV2235. Растения *Lycopersicon esculentum* сорта Marmande были декапитированы и раневое повреждение инокулировано *Agrobacterium* штамма С58С1 (рGV2235). Через месяц, до начала роста опухолевой ткани, появились многочисленные побеги, которые можно было срезать, укоренять и выращивать до зрелого состояния со 100 %-ной эффективностью.

Эти данные доказывают, что:
 а) выражения с Т-ДНК лишь транскриптов 4 и 6 достаточно, чтобы обеспечить гормон-независимый рост трансформированных клеток. В настоящее время ведутся опыты, цель которых выяснить, способен ли один транскрипт 4 поддерживать рост опухоли;

б) в корончатых галлах дикого типа действуют два дополняющих друг друга механизма, которые предотвращают развитие органов, подавляя формирование побегов или корней. Выражение одной из этих систем может способствовать росту растительных клеток в отсутствие экзогенных гормонов. От реакции растения-хозяина на гормон зависит, будут ли эти трансформированные клетки пролиферировать как опухолевые или нет. Например, корнеобразующий мутант плазмиды рGV2250 индуцирует на срезах моркови опухоли такого же размера, как у дикого типа, а на декапитированных растениях табака почти авирулентен. Однако при инокуляции стеблей табака легко образуются опухоли с обильной пролиферацией корней. Аналогичным образом мутанты, стимулирующие образование побегов, такие, как рGV2215, лишь в слабой степени аттенуированы на табаке, а высокой — на моркови и авирулентны — на большинстве тестированных бобовых растений. Такие мутанты при инокуляции ими срезов моркови, помещенных на среду с добавкой 2,4Д в концентрации 0,1 мкг/мл, которая не индуцирует рост каллуса, ведут себя как нормальные патогены.

НЕОНКОГЕННЫЕ Т-ДНК И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ

Чтобы использовать Т-ДНК в качестве генного вектора для растений, важно знать, сохраняется ли при супрессии или инактивации ее функций, ответственных за опухолевый рост (*onc*-ге-

нов), способность к трансформации растительных клеток без подавления регенерации в нормальные растения. Этого можно достичь тремя разными подходами.

1. Иногда нормальные растения, которые регенерируют из опухолей, индуцированных побегообразующими мутантами, синтезируют октопин (примерно в 1 случае из 250). Гибридизация по Саузерну и анализ геномных клонов таких растений показали, что в результате дополнительных мутаций у них утрачены онкогенные функции, так что остался лишь ген октопинсинтетазы [7]. У таких растений октопинсинтетаза проявляет себя как единичный доминантный менделирующий маркер (табл. 36.1) [13].

2. Штаммы *Agrobacterium*, несущие мутации Т-ДНК, которые приводят к инактивации транскрипта 4, индуцируют опухоли с обильной пролиферацией корней. В аксеничной культуре некоторые из этих корней дают многочисленные боковые корни. Такая аномальная морфология коррелирует с присутствием в них опинов.

Следовательно, подобные культуры очень похожи на бородатые корни, индуцируемые клетками *A. rhizogenes*.

Мы индуцировали корневые культуры растений табака, инфицированных штаммом *A. rhizogenes* 15834. Такие корни воспроизводимо давали побеги, которые развивались в целые растения. В таких растениях синтезируются те же самые опины, что и в родительской корневой ткани (нами получены культуры корней,

36.1. Менделирующий признак LpDH в трансформированных растениях табака.

Растения rGV1 ведут свое происхождение от опухолевой линии *N. tabacum* сорт Wisconsin 38, индуцированной плазмидой pGV2100, а rGV4 — от опухолевой линии табака того же сорта, индуцированной плазмидой pGV2206. Нетрансформированные растения JWB и Wisconsin 38 использовали в качестве дикого типа (ДТ) LpDH

Растеньца из другой культуры		LpDH ⁺	LpDH ⁻
rGV1		46%	54%
♀	♂	LpDH ⁺	LpDH ⁻
rGV1 × rGV1		76%	24%
ДТ × rGV1		50%	50%
rGV1 × ДТ		46%	54%
rGV4 × rGV4		72%	28%
rGV4 × rGV1		(15)	(1)
F1 (++)* × ДТ		76%	24%

Выводы: LpDH передается как доминантный маркер; rGRI и rGV4 гемизиготны по LpDH; яйцеклетки и пыльца LpDH⁺ фертильны; гены LpDH у rGV1 и rGV4 локализованы в разных локусах.

* () — абсолютные значения получены на 16 тестируемых растениях.

продуцирующие агропин и маннопин, только маннопин или вообще не образующие этих соединений). Растения-регенеранты отличаются от растений сорта Wisconsin 38 по следующим морфологическим признакам: а) корневая система гораздо более развита, корни обладают пониженным геотропизмом; б) стебли толще и с более короткими междоузлиями, поэтому в фазе цветения растения гораздо ниже; в) листья аномально удлиненные; г) цветки некоторых растений аномальные и обладают пониженной фертильностью; растения образуют различные количества семян после самоопыления.

Поскольку регенерация из бородатых корней сравнительно эффективна, то маловероятно, что переход от корней к растениям обусловлен выпадением части Т-ДНК *rhizogenes*. Более вероятно, что в них содержится вся Т-ДНК, которая каким-то образом супрессирована.

Исходя из этих результатов было бы интересно исследовать, аналогично ли ведут себя трансформированные культуры корней, индуцированных мутантными Ti-плазмидами.

3. Очевидными недостатками двух предыдущих подходов являются низкая частота регенерации трансформированных растений из побегоиндуцирующих тканей корончатых галлов и морфологические aberrации растений, регенерированных из бородатых корней.

Третий подход заключается в использовании мутантных Т-ДНК, у которых deletированы все *onc*-гены. Первым указанием на то, что такой подход может быть успешным, явилось обнаружение агропина и маннопина в раневой ткани срезов моркови, инфицированных авирулентной Ti-плазмидой рGV2217 [11]. У рGV2217 полностью deletирована TL-ДНК, но сохранились соседние TR-последовательности. Это означает, что гены, вовлеченные в синтез агропина и маннопина, кодируются TR-областью. Кроме того, результаты этого эксперимента свидетельствовали о том, что TR-ДНК может передаваться независимо от функций, закодированных в TL-области, без трансформации растительных клеток в опухолевые, если предположить, что синтез опинов в растительной ткани может осуществляться только после внедрения соответствующих генов при переносе Т-ДНК. Для подтверждения этой гипотезы регенерирующие протопласты из листьев *N. tabacum* SR1 были инфицированы клетками *A. tumefaciens* C58C1 (рGV2217). Колонии, образовавшиеся из протопластов, выращивали на среде, содержащей ауксин и цитокинин. Одна из 650 образовавшихся каллусных линий синтезировала маннопин в больших количествах. На основании этих данных был сделан вывод, что TR-ДНК может переноситься и поддерживаться в отсутствие TL-ДНК.

Поэтому мы рассматриваем TR-ДНК как природный вектор Т-ДНК, который при манипуляциях может быть альтернативой TL-ДНК, из которой удалены все *onc*-гены. Такая TL-ДНК содержится в авирулентной плазмиде рGV2224 (рис. 36.3), которая

также индуцирует синтез октопина в инфицированных тканях моркови [11].

В настоящее время установлены первичные последовательности на концах T-ДНК. Это позволяет конструировать векторы на основе T-ДНК с подходящими сайтами для клонирования, которые переносятся и встраиваются в геном растения, не влияя на морфогенетические потенции растительных клеток.

Благодарности. Авторы благодарят своих коллег из лаборатории генетики Гентского государственного университета, (Бельгия) и Научно-исследовательского института им. М. Планка (Кельн, ФРГ) за помощь и обсуждение. Эта работа финансировалась фондом фундаментальных исследований (Бельгия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Beuckeleer M De, Lemmers M, Vos G De, Willmitzer L, Montagu M Van, Schell J (1981) Further insight on the transferred-DNA of octopine crown gall. *Mol Gen Genet* 183:283—288
2. Chilton M-D, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D (1978) Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA, maintained in plant tumors. *Nature* 275:147—149
3. Depicker A, Montagu M Van, Schell J (1978) Homologous DNA sequences in different Ti-plasmids are essential for oncogenicity. *Nature* 275:150—153
4. Engler G, Depicker A, Maenhaut R, Villarroel-Mandiola R, Montagu M Van, Schell J (1981) Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Mol Biol* 152:183—208
5. Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon MP, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143—153
6. Greve H De, Dhaese P, Seurinck J, Lemmers M, Montagu M Van, Schell J (1982a) Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *J Mol Appl Genet* 1:499—512
7. Greve H De, Leemans J, Hernalsteens JP, Thia-Toong L, Beuckeleer M De, Willmitzer L, Otten L, Montagu M Van, Schell J (1982b) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 300:752—755
8. Haute E Van, Joos H, Maes M, Warren G, Montagu M Van, Schell J (1983) Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* *EMBO J* 2:411—417
9. Joos H, Inzé D, Caplan A, Sormann M, Montagu M Van, Schell J (1983) Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls. *Cell* 32:1057—1067
10. Leemans J, Shaw C, Deblaere R, Greve H De, Hernalsteens JP, Maes M, Montagu M Van, Schell J (1981) Site-specific mutagenesis of *Agrobacterium* Ti plasmids and transfer of genes to plant cells. *J Mol Appl Genet* 1:149—164
11. Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *EMBO J* 1:147—152
12. Lemmers M, Beuckeleer M De, Holsters M, Zambryski P, Depicker A, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schell J (1980) Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. *J Mol Biol* 144:353—376

13. Otten L, Greve H De, Hernalsteens JP, Montagu M Van, Schieder O, Straub J, Schell J (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 183:209—213
14. Ruvkun GB, Ausubel FM (1981) A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* 289:85—88
15. Shepard J, Bidney D, Shahin E (1980) Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208:17—24
16. Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1980) Integration and organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19:729—739
17. Willmitzer L, Simons G, Schell J (1982) The TL-DNA in octopine crown gall tumours codes for seven well-defined polyadenylated transcripts. *EMBO J*:139—146
18. Willmitzer L, Dhaese P, Schreier PH, Schmalenbach W, Montagu M Van, Schell J (1983) Size, location and polarity of T-DNA-encoded transcripts in nopaline crown gall tumors: evidence for common transcripts present in both octopine and nopaline tumors. *Cell* 32:1045—1056



**Фитопатогенные бактерии
и смежные вопросы**

37. ГЕНЕТИКА ПАТОГЕНА ВИШНИ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* pathovar *MORSRUNORUM*

А. ВИВИАН *, ДЖ. ЭРРИНГТОН ** и Д. ВИЛ *

ВВЕДЕНИЕ

Pseudomonas syringae pathovar *morsprunorum* (далее именуемый сокращенно *pv. morsprunorum*) является возбудителем бактериального рака у косточковых плодовых культур сливы (*Prunus domestica*) и вишни (*Pr. avium*) в Англии [3]. Штаммы *pv. morsprunorum* специфичны либо для сливы, либо для вишни и проявляют слабую способность к перекрестной инфекции. Специфичные для вишни штаммы подразделяются на две расы, 1 и 2, на основе их специфичности к определенным сортам [7]. В таблице 37.1 показано дальнейшее подразделение этих двух рас на основе лабораторных испытаний [8, 9]. Не вызывает сомнения тот факт, что в вишневых садах представлен спектр рас штаммов *pv. morsprunorum*, и одна из целей настоящего исследования заключалась в применении генетического анализа для изучения основ различий, проявляемых этими организмами.

37.1. Характеристика рас английских штаммов *Pseudomonas morsprunorum*, поражающих вишню

Подразделение	Предпочитаемый сорт вишни	Желатин	Арбутин	Пигмент	Ø A7	Ø B1
Раса 1 флуоресцирующая	Napoleon	—	—	+	+	—
Раса 2 нефлуоресцирующая	Napoleon	—	—	—	+	—
Раса 2, группа 1	Roundel	+	—	—	+	+
Раса 2, группа 2	Roundel	+	—	+	+	+
Раса 2, группа 3	Roundel	+	+	+	—	+

Для генетического анализа был выбран нефлуоресцирующий вишневый штамм расы 1, получивший обозначение С28. У штамма С28 обнаружена природная система переноса генов, особенно полезная для создания новых комбинаций ауксотрофных маркеров [6]. Штаммы ведут себя либо как доноры, либо как реципиенты, и в скрещиваниях с участием лишь реципиентных штаммов рекомбинанты не образуются. Однозначное сцепление было установлено только между тремя парами маркеров [5], картирование же дру-

* A. Vivian, D. Veal, School of Biological Sciences and Environmental Health, Thames Polytechnic, London, SE18 6PF, United Kingdom.

** J. Errington, Present address: Microbiology Unit, Department of Biochemistry, South Parks Road, Oxford, OX1 3QU, United Kingdom.

гих маркеров было затруднено из-за низких уровней фертильности (Малик и Вивриан, *неопубликованные данные*).

В дополнение к указанной системе скрещиваний мы попытались использовать трансмиссивные плазмиды из других бактерий, чтобы мобилизовать хромосому штамма C28. Здесь мы опишем ход этих экспериментов и обнаружение штаммов с повышенной способностью поддерживать плазмиды (Ipm⁻)*.

Все генетические штаммы, ведущие начало от штамма C28, обозначены префиксом E.

Наследование плазмиды RP4 ауксотрофными вариантами штамма C28

Скрещивания, проведенные на фильтрах при 25 °C между штаммом *E. coli*, несущим RP4, и тремя независимо выделенными ауксотрофными вариантами штамма дикого типа *rv. morsprunorum* C28, показали, что плаزمида RP4 передается последним с относительно низкой частотой (табл. 37.2a). В каждом скрещивании выделено по три трансконъюганта, у которых проявлялись как селективируемый маркер устойчивости к тетрациклину (Tet^R), так и неселективируемые маркеры устойчивости к канамицину (Kan^R) и ампициллину (Amp^R). Присутствие в трансконъюгантах плазмиды RP4 подтверждено электрофорезом лизатов из отдельных колоний в агарозном геле [4].

37.2. Приобретение RP4 от *E. coli*. Скрещивания на фильтрах проводили со штаммом *E. coli* J53 *pro met* RP4⁺, служившим донором

Реципиент <i>rv. morsprunorum</i>			Частота переноса*
a) Ipm ⁺	E32	<i>leu-1, met-3</i>	$1,7 \times 10^{-6}$
	E66	<i>his-1, ilv-2</i>	$1,8 \times 10^{-6}$
	E71	<i>met-5, trp-1</i>	$1,2 \times 10^{-6}$
b) Ipm ⁻	E39	<i>leu-1, met-3</i>	$8,9 \times 10^{-2}$
	E612	<i>his-1, ilv-2</i>	$2,0 \times 10^{-1}$
	E714	<i>met-5, trp-1</i>	$1,3 \times 10^{-1}$
	E93	<i>gly-1, thi-3</i>	$9,7 \times 10^{-2}$

* Отношение числа Tet^R-трансконъюгантов к числу реципиентных клеток.

Получение штаммов с повышенной способностью к поддержанию плазмид (Ipm⁻)

Колонии штамма E71 *met-5 trp-1* скрещивали методом отпечатков на чашках [10] с *E. coli* J53 RP4⁺ и отбирали трансконъюгантов E71 Tet^R. Среди 1124 тестированных колоний таким путем удалось найти одну колонию, которая наследовала маркер Tet^R с гораздо более высокой частотой. Штамм, ведущий свое начало от этой колонии, обозначен E714; получены также аналогичные

* Interference with Plasmid Maintenance, помехи поддержанию плазмид.

Irm⁻-варианты штаммов E32 *leu-1 met-3* (1/1733 колоний) и E66 *his-1 ilv-2* (1/1990 колоний), которые обозначены E39 и E612 соответственно. Скрещивания на фильтрах таких Irm⁻-штаммов с *E. coli* RP4⁺ подтвердили, что эта плазмида приобретает ими с гораздо более высокой частотой (табл. 37.2). Был обнаружен еще один штамм, E93 *gly-1 thi-3*, который выглядит как «спонтанный» Irm⁻-мутант, поскольку получен как ауксотрофное производное C28, но идентичен Irm⁻-штаммам по способности приобретать плазмиду RP4.

Приобретение плазмид других групп несовместимости Irm⁻-штаммами

Изменение способности приобретать плазмиды от *E. coli* не ограничивалось плазмидой RP4. В скрещиваниях на фильтрах и другие плазмиды группы несовместимости P, такие как R702, а также Inc-W-плазмида S-a, вели себя подобно RP4 (табл. 37.3).

37.3. Частота приобретения плазмид штаммами рв. *morsprunorum* от *E. coli*; скрещивания выполнялись на фильтрах. В каждом скрещивании донором служил штамм *E. coli* J62 *pro, his, trp, lac* R702⁺ или J53-1 *pro, met, nal* S-a⁺

Реципиент			Частота приобретения от донора*	
			(a) R702 ⁺	(b) S-a ⁺
Irm ⁺	E32	<i>leu-1, met-3</i>	$1,6 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-6}$
	E66	<i>his-1, ilv-2</i>	$1,8 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^{-6}$
	E71	<i>met-5, trp-1</i>	$1,7 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-5}$
Irm ⁻	E39	<i>leu-1, met-3</i>	$4,3 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-2}$
	E612	<i>his-1, ilv-2</i>	$2,6 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$
	E714	<i>met-5, trp-1</i>	$2,5 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-2}$

* Отношение числа R⁺-трансконъюгантов к числу реципиентных клеток.

37.4. Частота приобретения плазмид штаммами рв. *morsprunorum* от *E. coli*; скрещивания выполнялись методом отпечатков на чашках

Плазмида	Группа несовместимости	Отбор* по	Приобретения штаммом	
			Irm ⁺	Irm ⁻
R57b	C	Kan/Sul	Н. у.**	Низкая
R1-16	FII	Kan/Sul	Н. у.	Н. у.
R64	I	Tet	Н. у.	Н. у.
R391	J	Kan	Н. у.	Н. у.
R702	P	Kan/Sul/Tet	Низкая	Высокая
RP4	P	Kan/Tet	Низкая	Высокая
R388	W	Sul	Н. у.	Высокая
S-a	W	Kan/Sul	Низкая	Высокая

* Устойчивости: Kan — к канамицину; Sul — к сульфаниламидам; Tet — к тетрациклину.

** Н. у. — не установлено.

Для изучения способности ряда плазмид к переносу в Irm^+ и Irm^- -штаммы воспользовались скрещиваниями методом отпечатков на чашках; их результаты сведены в таблице 37.4. Следует отметить, что плазида R57b, относящаяся к группе несовместимости Inc C, при этом приобреталась Irm^- , но, по-видимому, не Irm^+ -штаммами.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСПОЗОНА Tn5

Штамм *E. coli* PFB3, несущий Kan^S -производную плазмиды R68.45, скрещивали со штаммом *E. coli* UNF510 (оба штамма любезно предоставлены доктором Джонстоном из Института им. Джона Иннеса, Норвич, Англия), несущим Tn5 с маркером Kan^R [1], и вели отбор на перенос плазмиды. Полученный штамм $Kan^R Tet^R$ скрещивали с другим штаммом *E. coli* 5K⁻, дефектным по рестрикции и модификации [2], и вели отбор трансконъюгантов Kan^R и Tet^R . Один из таких трансконъюгантов, PU5K, нес плазмиду с молекулярной массой, соответствующей плазмиде R68.45 плюс Tn5. Этот штамм скрестили с различными Irm^+ и Irm^- -штаммами и отдельно вели отбор Kan^R - и Tet^R -трансконъюгантов. Результаты, представленные в таблице 37.5, вновь указывают на разницу в способности приобретать плазмиды (Tet^R) между Irm^+ и Irm^- -штаммами. Однако Irm^+ -штаммы приобретают Tn5 (Kan^R) с гораздо большей частотой, чем плазмиду R68.45 (Tet^R). Это означает, что R68.45 с трудом поддерживается в Irm^+ -штаммах, по крайней мере, сразу после переноса. Свидетельств нестабильности R68.45 в Irm^+ -штаммах после того, как они отобраны в качестве трансконъюгантов, нет. Irm^- -штаммы приобретают R68.45 и Tn5 совместно, т. е. у таких штаммов нет помех поддержанию плазмиды. Аналогичные результаты получены с плазмидой RP4::Tn5 в Irm^+ - и Irm^- -штаммах (Вил и Вивиан, данные не представлены).

37.5. Частота приобретения транспозона Tn5 Irm^+ - и Irm^- -вариантами штамма рв. *morsprunorum* C28. Донорным штаммом в скрещиваниях на фильтрах был *E. coli* PU5K *lac, thr, leu, thi, tonA, hsmK, hsrK*, R68.45::Tn5

Реципиентный штамм			Частота* трансконъюгантов, отобранных по признаку:	
			Kan^R	$Kan^R Tet^R$
C28	дикий тип	Irm^+	$1,1 \times 10^{-5}$	$6,6 \times 10^{-7}$
E71	<i>met-5, trp-1</i>	Irm^+	$7,4 \times 10^{-5}$	$< 1,0 \times 10^{-8}$
E66	<i>his-1, ilv-2</i>	Irm^+	$4,5 \times 10^{-6}$	$< 1,0 \times 10^{-8}$
E714	<i>met-5, trp-1</i>	Irm^-	$1,9 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
E612	<i>his-1, ilv-2</i>	Irm^-	$2,6 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$

* Число трансконъюгантов на реципиентную клетку; Kan^R — устойчивость к канамицину; Tet^R — устойчивость к тетрациклину.

Способность Irm-штаммов служить донорами плазмид

Вначале полагали, что Irm⁻-фенотип может образоваться в результате утраты или инактивации системы рестрикции/модификации C28 и его вариантов. Однако если бы это было так, то редкие трансконъюганты Irm⁺ RP4⁺ должны были бы нести модифицированную RP4, и потому последующий ее перенос в другие Irm⁺-штаммы должен был бы происходить с более высокой частотой.

С целью выяснения этой возможности сто Tet^R-трансконъюгантов скрещивания между *E. coli* J53 RP4 и E49 *ilv-4 nic-3 trp-4 str-5* Irm⁺ тестировали, скрещивая методом отпечатков на чашках, на их способность приобретать IncW-плазмиду S-a. Два трансконъюганта были Irm⁺, а остальные — Irm⁻. Было выделено по одному трансконъюганту каждого типа, и эти штаммы, E53 Irm⁻ и E54 Irm⁺, скрестили на фильтрах с другими Irm⁺- и Irm⁻-штаммами. Результаты представлены в таблице 37.6. Перенос RP4 наблюдался только между Irm⁻-родителями. Последующие скрещивания с целью переноса RP4 и R702 (Inc P) из штаммов pv. *morsprunorum* в *E. coli* показали, что лишь Irm⁻-штаммы способны служить донорами своей плазмиды. Кроме того, частота передачи плазмид такими штаммами была низкой в сравнении с частотой переноса плазмид между штаммами *E. coli* (табл. 37.6). Получается, что у Irm⁺-штаммов нарушена способность как приобретать, так и передавать плазмиды. Поэтому установить, играет ли какую-либо роль в поведении плазмид система рестрикции/модификации C28, не удалось.

37.6. Способность Irm⁺ и Irm⁻-вариантов штамма pv. *morsprunorum* C28 служить донором. Все штаммы с префиксом E ведут свое происхождение от штамма C28. 5K⁻ —, J53 и J62.1 — штаммы *E. coli*. Частоты переноса между штаммами *E. coli* даны для сравнения

Донорный штамм		Реципиентный штамм	Селектируемая плаزمида	Частота трансконъюгантов*	
E54	Irm ⁺	E32	Irm ⁺	RP4	H. y.**
E54	Irm ⁺	E39	Irm ⁻	RP4	H. y.
E54	Irm ⁺	5K ⁻	—	RP4	H. y.
E78	Irm ⁺	5K ⁻	—	R702	H. y.
E80	Irm ⁺	5K ⁻	—	S-a	H. y.
E53	Irm ⁻	E32	Irm ⁺	RP4	H. y.
E53	Irm ⁻	E39	Irm ⁻	RP4	1,9×10 ⁻⁶
E53	Irm ⁻	5K ⁻	—	RP4	1,4×10 ⁻⁴
E721	Irm ⁻	5K ⁻	—	R702	1,1×10 ⁻⁶
E725	Irm ⁻	5K ⁻	—	S-a	H. y.
J62-1		5K ⁻	—	R702	2,4×10 ⁻²
J53		5K ⁻	—	S-a	6,1×10 ⁻²

* Число трансконъюгантов Tet^R (RP4, R702) или Sul^R (S-a) на реципиентную клетку.

** H. y. — не установлено (<1,0×10⁻⁶).

Стабильность Irt⁻-штаммов

При анализе Irt⁺- и Irt⁻-штаммов в агарозных гелях методом Экхарда [4] каких-либо плазмидных различий у этих штаммов обнаружено не было. Однако мы рассмотрели возможность того, что некая плазида, не обнаруживаемая указанным методом, могла быть утрачена Irt⁻-штаммами. В этом случае можно было бы провести «повторную инфекцию» Irt⁻-штамма утраченной плазмидой и превратить его в Irt⁺-штамм. Проведено шесть скрещиваний между всеми возможными комбинациями Irt⁻-штаммов с подходящими Irt⁺-штаммами, однако среди 18654 проанализированных родительских Irt⁻-колоний «трансконъюганты» Irt⁺ обнаружены не были.

В течение трех лет после первоначального выделения Irt⁻-штаммов спонтанных Irt⁺-реверсий не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несколькими исследователями было показано, что различные Ipc Р-плазмиды могут легко передаваться от *E. coli* ряду фитогенных псевдомонад [11, 12]. Перенос RP4 в клетки *rv. morsprunogit* C28 происходил с аналогичной частотой, но последующая повторная передача от них в другие штаммы C28 и *E. coli* не была обнаружена. Получены Irt⁻-варианты штамма C28, которые проявляют: 1) повышенную способность принимать некоторые плазмиды от *E. coli*; 2) повышенную способность поддерживать эти плазмиды (по крайней мере, сразу после переноса) и 3) способность служить после этого донорами плазмид для *E. coli* и других штаммов C28. Однако генетическая основа Irt⁻-фенотипа остается неясной.

Электрофорез лизатов единичных колоний в агарозном геле не позволил выявить плазмидных изменений у Irt⁺- и Irt⁻-штаммов.

Однако не исключено, что данный метод не позволяет обнаружить все плазмиды, присутствующие в штамме C28. Альтернативная гипотеза состоит в том, что возникновение Irt⁻-вариантов обусловлено неким транспозиционным или эксцизионным событием в геноме.

Несмотря на то что природа Irt⁻-вариантов не выяснена, потенциально они полезны для создания альтернативной системы картирования для C28. Хотя частоты переноса RP4 и R68.45 между Irt⁻-штаммами сравнительно низки и не позволяют выявить мобилизацию хромосомы, выделение штаммов с повышенным донорским потенциалом (Эррингтон и Вивиан, *неопубликованные результаты*) открывает широкие возможности для манипуляций геномом *in vivo* и *in vitro*.

Благодарности. Работа финансировалась Научно-исследовательским советом по науке и технике, а также Опытной станцией Ист-Меллинг (Кент, Англия) и Научно-исследовательским

советом по сельскому хозяйству. Авторы выражают особую благодарность доктору К. Гаррет за интерес к данной работе и ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berg D, Davies JE, Allet B, Rochaix J-D (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. Proc Natl Acad Sci USA 72:3628—3632
2. Colson C, Glover SW, Symonds N, Stacey KA (1965) The location of the genes for host-controlled modification and restriction in *Escherichia coli* K12. Genetics 52:1043—1050
3. Crosse JE (1966) Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. Annu Rev Phytopathol 14: 291—310
4. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria. Plasmid 1:584—588
5. Errington J (1981) The genetics of *Pseudomonas morsprunorum*. Ph D Thesis CNAА
6. Errington J, Vivian A (1981) An indigenous system of gene transfer in the plant pathogen, *Pseudomonas morsprunorum*. J Gen Microbiol 124:439—442
7. Freigoun SO, Crosse JE (1975) Host relations and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. Ann Appl Biol 81:317—330
8. Garrett CME, Panagopoulos CG, Crosse JE (1966) Comparison of plant pathogenic *Pseudomonads* from fruit trees. J Appl Bacteriol 129:342—356
9. Garrett CME, Prunier J-P, Crosse JE (1977) Bacterial canker of stone fruits: virulence of typical and variant forms of *Pseudomonas morsprunorum* in wound inoculations. Rep East Malling Res St 1976:127—128
10. Hinchliffe E, Vivian A (1980) Naturally occurring plasmids in *Acinetobacter calcoaceticus*: a P class R factor of restricted host range. J Gen Microbiol 116:75—80
11. Lacy GH, Leary JV (1975) Transfer of antibiotic resistance plasmid RP1 into *Pseudomonas glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola* in vitro and in planta. J Gen Microbiol 88:49—57
12. Panopoulos NJ, Guimaraes WV, Cho JJ, Schroth MN (1975) Conjugative transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant pathogenic *Pseudomonas* spp. Phytopathology 65:380—388

38. ПОДХОД К ГЕНЕТИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ ПАТОГЕННОСТИ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

М. ДАНИЕЛС, П. ТЭРНЕР, К. БАРБЕР, У. КЛИРИ
и Г. РИД*

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большой размах физиологических исследований, основы бактериальной патогенности для растений пока неясны. Можно ожидать а priori, что взаимодействие хозяина и паразита представляет собой сложный процесс, при котором специфические реакции происходят на многих уровнях. В то время как роль возможных детерминант вирулентности, таких, как токсины, анаболические ферменты или полисахариды, поддается исследованию, трудно даже предполагать, каковы механизмы, лежащие в основе таких свойств патогена, как агрессивность, органо- и тканеспецифичность, способность преодолевать защитные механизмы, а также свойств, определяющих появление симптомов заболевания. Логический подход к этой проблеме заключается в выделении непатогенных мутантов путем массовой проверки непосредственно на растениях (без предварительных гипотез о биохимической природе повреждений) и последующего применения современных методов молекулярной генетики для изучения функции соответствующих генов. Для выделения мутантов необходимо индивидуально проверять большие количества мутагенизированных бактерий на растениях. Однако из-за существования многочисленных фитопатогенов методы инокуляции слишком сложны для практического применения. Тем не менее мы разработали для *X. campestris* — возбудителя черной гнили крестоцветных — методику, которая позволяет легко и надежно инокулировать более 1000 семян турнепса в день. В настоящей статье мы описываем применение этого теста для выделения непатогенных мутантов. Мы предпочли метод мутагенеза с помощью транспозона Tn5 ввиду его многих преимуществ при последующих манипуляциях [5].

МЕТОДЫ

Бактерии

X. campestris pv. *campestris* NCPPB1145 был выбран в качестве стандартного штамма дикого типа, поскольку он хорошо растет, обладает высокой патогенностью и чувствителен к антибиотикам. В большинстве опытов использовался спонтанный мутант 8004,

* M. J. Daniels, P. C. Turner, C. E. Barber, W. G. Cleary, and G. Reed, John Innes Institute, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, England.

устойчивый к рифампицину (100 мкг/мл) и полностью сохраняющий патогенность. Штамм *Escherichia coli* SM10 (несущий плазмиду р1011) получен от Р. Симона через Г. Хомбрехера, а штамм 1843 (несущий рJB3JI) — от А. Джонстона. Полная среда (NYG) содержала пептон (0,5 %), дрожжевой экстракт (0,3 %) и глицерин (2 %), а минимальная среда (ММХ) почти не отличалась по составу от минимальной среды А [6]. Культуры *X. campestris* инкубировали при 25 °С. Скрещивания проводили путем смешения ночных культур донорного и реципиентного штаммов и переноса клеток на мембранные фильтры, которые инкубировали на чашках со средой NYG в течение ночи при 25 °С. Затем бактерии ресуспендировали в воде и высевали на подходящие среды.

Тест на патогенность

Семена турнепса (*Brassica rapa*, сорт Just Right) стерилизовали коммерческим препаратом 10 %-ной хлорной извести в течение 30 мин, промывали несколько раз стерильной водой и помещали на ночь на водяной агар при 25 °С. Проросшие семена переносили по отдельности в лунки «Replidish» (фирмы «Стерилин», Англия), содержащие по 3 мл агаризованной среды для культивирования растительных тканей, разбавленной в 4 раза [7]. Через 3—4 дня проростки инокулировали при 25 °С путем укола в стебель заостренной нихромовой иглой, которой предварительно касались бактериальной колонии. Растения инкубировали при 25 °С во влажной атмосфере и ежедневно осматривали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристики теста на патогенность

На инокулированных проростках в течение 3—4 дней развивались симптомы болезни. Через 12—24 ч стебли вокруг точки инокуляции сплющивались. Сплюснутые участки распространялись вверх и вниз по стеблям, постепенно загнивали и становились водянистыми. Семядоли желтели, и 4 дня спустя проростки полностью загнивали и отмирали. Проростки, инокулированные с помощью стерильной иглы клетками *X. campestris*, убитыми под действием CHCl_3 или живыми сапрофитными бактериями (например, *E. coli* или неидентифицированными загрязняющими микроорганизмами), не обнаруживали симптомов заболевания, за исключением появления иногда бурых пятнышек размером 0,2 мм вокруг точки укола, и продолжали развиваться нормально. На развитие симптомов заметно не влияли интенсивность света и температура (15 или 20 °С). При испытании индивидуальных колоний *X. campestris* дикого типа на отдельных проростках 90—95 % из них обнаруживали типичные симптомы болезни. Проростки, у которых после первой инокуляции не было обнаружено симптомов, неизменно проявляли их при повторной. Число бактерий в проростках

(или на их поверхности) определяли, гомогенизируя растительные ткани в воде и производя посевы после последовательного разведения гомогената. Число бактерий сразу после инокуляции составляло 10^5 — 10^6 на проросток, по мере развития симптомов их число увеличивалось до 10^8 — 10^9 . В период, когда скорость увеличения числа бактерий была максимальной, время удвоения их численности составляло около 4 ч. Для сравнения укажем, что при 25°C в бульонных культурах при встряхивании клетки *X. campestris* удваиваются в числе за 3 ч. Нагружая иглу для инокуляции последовательно разведенными суспензиями бактерий, удалось определить минимальное число клеток, необходимое для успешной инициации инфекции. Оно составляет примерно 10^3 .

Тп5-Мутагенез

Плазмида p1011 является производной pACYC184 [2], несущей гены *tob* от RP4, вставленные в Tc^R-ген. В дополнение к Тп5-кодируемой устойчивости к канамицину эта плазмида придает устойчивость к хлорамфениколу. Гены *tob* позволяют плазмиде мобилизоваться под действием продуктов генов подходящей *tra*⁺-плазмиды, в данном случае плазмиды RP4::Mu, интегрированной в хромосому хозяина (SM10). Мы рассчитывали на то, что p1011 будет не способна поддерживаться в клетках *X. campestris* после конъюгационного переноса, так что устойчивые к канамицину колонии будут возникать только при транспозиции Тп5 в репликоны *X. campestris*. Устойчивые колонии появлялись с частотой 10^{-6} — 10^{-7} на реципиент после скрещиваний со штаммом *E. coli* SM10; их переносили на чашки (NYG + рифампицин + канамицин), а затем перепечатавали на среды ММХ, ММХ + казаминокислоты и вновь на чашки со средой NYG. Ауксотрофы по аминокислотам (т. е. колонии, растущие на средах NYG и ММХ + казаминокислоты, но не на ММХ без добавок) составляли около 0,3 %. Помимо одного мутанта с потребностью в аргинине и другого с потребностью в треонине остальные мутанты еще не охарактеризованы. Колонии, перепечатанные на чашки со средой NYG, тестировали на патогенность. Те из них, которые не вызывали симптомов или вызывали необычную реакцию, были тестированы повторно и при получении тех же результатов брались для дальнейшего изучения. Такие потенциально непатогенные мутанты составляли около 0,5 % устойчивых к канамицину колоний. Для сравнения укажем, что в контрольных тестах из примерно 1000 немутагенизированных колоний непатогенных вариантов не было. Такие мутанты были чувствительны к хлорамфениколу и карбенициллину и устойчивы к бактериофагу PRD1, который инфицирует только клетки, несущие плазмиды Р-группы [8]; их устойчивость к канамицину не передавалась в скрещиваниях с другими штаммами *X. campestris*, следовательно, устойчивый к канамицину фенотип обусловлен транспозицией Тп5, а не стабильным поддержанием p1011 или переносом RP4::Mu. Мутанты, выращенные на мембранных филь-

рах и лизированные *in situ* [4], давали гибридизацию с ^{32}P -меченой пробной ДНК Tn5 (*Hind*III-фрагментом длиной 3,3 т. п. н.). Наконец, для мобилизации маркера устойчивости к канамицину из Tn5-ауксотрофов в устойчивый к спектиномицину штамм *X. campestris* использовали производную R68.45, которая не сохранила маркер устойчивости к канамицину, но сохранила способность к мобилизации хромосомы (pJB3JI [1]). На ауксотрофию тестировали около 250 колоний из каждого скрещивания; совместное наследование устойчивости к антибиотику с потребностью в аминокислоте было полным (98,5—100 %). Хотя подобные эксперименты со всеми мутантами еще не закончены, полученные результаты свидетельствуют о том, что непатогенный фенотип обусловлен Tn5-вставкой.

Свойства непатогенных мутантов

Непатогенные мутанты не были загрязнены: они сохраняли устойчивость к рифампицину родительского штамма и обладали идентичными профилями суммарных клеточных белков при ДСН-полиакриламидном гель-электрофорезе, что является чувствительным индикатором идентичности бактериальных штаммов [3]. Эти эксперименты показали также, что ни одна из мутаций не привела к потере какой-либо из примерно 50 крупных полипептидных полос, обнаруживаемых в одномерных белковых гелях.

Ни один из мутантов по патогенности не обнаруживал заметной разницы в поведении вне растения. Все они были прототрофны и росли примерно с той же скоростью, что и родительский штамм, а также обладали сходной морфологией колоний. Вариан-

8.1. Свойства Tn5-индуцированных непатогенных мутантов. Группы из пяти проростков инокулировали последовательно разведенными клеточными суспензиями *X. campestris*. Через три дня оценивали среднюю степень выраженности симптомов на каждом проростке

Штамм	Оценка симптомов* Относительная концентрация инокулюма					Раст**
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
8004 (дикий тип)	++	++	+	+	—	160
8208-1	+	+	—	—	—	2
8208-2	±	—	—	—	—	10
8208-3	+	—	+	±	+	7
8208-4	—	—	±	—	—	4
8208-6	+	—	—	—	—	10
8208-7	—	+	—	—	—	2
8208-8	+	+	—	—	—	2

* ←→ — отсутствие видимых симптомов; ←± — частичное сплющивание стебля и загнивание, ←++ — полностью выраженные симптомы (см. текст).

** Показывает, во сколько раз увеличилось среднее число жизнеспособных бактерий на проростке через два дня после инокуляции.

ты с измененной морфологией колоний, по-видимому, обусловленные изменениями в синтезе полисахаридов или пигментов, у устойчивой к канамицину популяции обнаружены были, однако все такие, тестированные до сих пор варианты сохранили патогенность.

Симптомы, вызываемые мутантами на проростках, варьировали от отсутствия видимого повреждения или светло-коричневого кольца вокруг точки инокуляции до ограниченного поражения стебля вокруг места укола, где здоровая ткань не восстанавливалась.

Однако у некоторых мутантов дефект, по-видимому, был неполным: чем большее число таких бактерий бралось для инокуляции проростков, тем более четко были выражены симптомы (табл. 38.1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее эффективным и экономным способом изучения свойств сложной биологической системы является выделение мутантов со специфическими изменениями изучаемого процесса. В случае болезней растений такой подход применялся в ограниченных масштабах (например, при изучении роли некоторых ферментов), но полностью его возможности не использовались вследствие технической трудности тестирования больших количеств мутантов по патогенности. Мы разработали тест, позволяющий анализировать 10^3 мутантов в день, так что если транспозон не проявляет особой сайт-специфичности в отношении вставок, то имеется возможность обнаружить большое число генов «патогенности», о функциях которых мы пока не можем даже догадываться.

Следует подчеркнуть, что наш тест на патогенность является способом массовой проверки, а не модельной системой для изучения всего цикла болезни. В полевых условиях *X. campestris* зачастую попадает в растения через естественные отверстия, в частности через гидатоды [9]. Есть данные, свидетельствующие о том, что некоторые устойчивые сорта, вероятно, менее восприимчивы к вторжению патогенов таким путем [10]. Мутации в каких-либо бактериальных генах, которые определяют такой способ вторжения, не будут выявлены с помощью нашего теста. Тем не менее изучение мутантов, подобных тем, которые мы описали, может дать немало сведений о путях протекания болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 120:413—420
2. Chang ACY, Cohen SN (1978) Construction and characterisation of amplifiable DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic mini plasmid. J Bacteriol 134:1141—1156

3. Daniels MJ, Archer DB, Stephens MA, Townsend R, Longland JM, Best J (1980) Comparison of spiroplasmas by polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins. *Curr Microbiol* 4:377—380
4. Humphries P, Old R, Coggins LW, McShane T, Watson C, Paul J (1978) Recombinant plasmids containing *Xenopus laevis* globin structural genes derived from complementary DNA. *Nucleic Acids Res* 5:905—924
5. Kleckner N, Roth J, Botstein D (1977) Genetic engineering in vivo using translocatable drugresistance elements. *J Mol Biol* 116:125—159
6. Miller J (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
7. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473—497
8. Olsen RH, Sang-Siak J, Gray RH (1974) Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage. *J Virol* 14:689—699
9. Smith EF (1897) *Pseudomonas campestris* (Pammel). The cause of a brown rot in cruciferous plants. *Zentralbl Bakteriol Abt II* 3:284—291, 408—415, 478—486
10. Staub T, Williams PH (1970) The resistant reaction in cabbage to *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 60:1315

39. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ У *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*

Б. СТАСКАВИЧ, Д. ДАЛЬБЕК, ДЖ. МИЛЛЕР
и Д. ДАММ *

ВВЕДЕНИЕ

P. solanacearum, возбудитель бактериального увядания, является губительным патогеном многих пасленовых культур [3]. Показано, что способность этой бактерии синтезировать внеклеточный полисахарид (ВПС) коррелирует с вирулентностью [7]. Вирулентный фенотип легко выявляется по внешнему виду колоний на сложной среде, содержащей тетразол [7]. Вирулентные колонии слабо-розовые и синтезируют большие количества ВПС, тогда как спонтанные авирулентные мутанты выглядят ярко-красными и не продуцируют ВПС. Двумя группами исследователей [5, 12] было продемонстрировано, что авирулентные мутанты содержат те же природные плазмиды, что и штамм дикого типа. Таким образом, генетические механизмы, ответственные за указанные изменения фенотипа, еще неизвестны. Для идентификации и клонирования генов, определяющих вирулентность, мы воспользовались методом транспозонного мутагенеза [2, 8]. Здесь мы сообщаем об успешной идентификации и характере локуса вирулентности, вовлеченного в образование ВПС у *P. solanacearum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, плазмиды и транспозоны
(см. табл. 39.1)

Ростовые среды и концентрации антибиотиков. Клетки *P. solanacearum* обычно культивировали в сложной среде CPG [7] и выявляли «нефлюидальные» мутанты в среде TZC-CPG, содержащей пептон, казаминокислоты и 0,5 % -ный хлористый тетразол. Штаммы *E. coli* выращивали на агаризованной среде Луриа. Применяли следующие концентрации антибиотиков: канамицин (Km) 50 мкг/мл, гентамицин (Gm) 25 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) 25 мкг/мл, стрептомицин (Sm) 25 мкг/мл, рифампицин (Rif) 100 мкг/мл. Использовали также минимальные среды АВ [4].

Скрещивания на фильтрах. Все скрещивания выполняли на среде CPG в течение 16 ч на миллиметровых фильтрах размером 25 мм. Клетки донора и реципиента брали в соотношении 1:1 в случае скрещивания HB101 (pJB4J1) × Ps82 Rif. Куль-

* B. J. Staskawicz, D. Dahlbeck, J. Miller, and D. Damm, International Plant Research Institute, San Carlos, Ca 94070, USA.

39.1. Бактериальные штаммы, плазмиды и транспозоны

Штамм	Существенные признаки	Источник
<i>Pseudomonas solanacearum</i> S-82 <i>P. solanacearum</i> Ps82Rif	Дикий тип Устойчивый к рифампицину мутант	Л. Секиера Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps-82-2NR	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-18	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-293	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-303	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-305	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-316	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-316FR	Km ^R , Gm ^S , Tn5; нефлюидальный, вирулентный	Данная работа
<i>P. solanacearum</i> Ps82-497	Km ^R , Gm ^S , Tn5, IS50; нефлюидальный, авирулентный	Данная работа
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>recA</i> , Sm ^R	Н. Панопулос
<i>E. coli</i> C600	Sm ^S	Н. Панопулос
Плазмиды		
pJB4J1	Km ^R , Gm ^R , Tn5, лизогенный по Mu	Дж. Беринджер
pRZ102	COLE1: :Tn5	Р. Иоргенсен
RSF1010	Su ^R Sm ^R	Н. Панопулос
pBR325	Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R	Н. Панопулос
pKR2013	Km ^R , Tra ⁺ , плаزمида-помощник	Г. Дитта
PKT210	Su ^R , Sm ^R , Cm ^R	К. Тиммис
pPsDDMS1	Amp ^R , Cm ^S , Tc ^R	Данная работа
pPsDDMS18	Amp ^R , Cm ^S , Tc ^R , IS50	Данная работа
pPsDDMS316	Amp ^R , Cm ^S , Tc ^R , IS50	Данная работа

туры в поздней логарифмической фазе (10^9 клеток/мл) смешивали и помещали на миллипоровые фильтры. Проводили также трехродительские скрещивания при равных соотношениях всех родителей. После скрещивания бактерий смывали с фильтров дистиллированной водой и переносили на подходящие селективные среды.

Выделение плазмид и трансформация *E. coli*. Применяли методы, описанные Маниатисом и др. [9].

Электрофорез в агарозном геле. Применяли 0,7 %-ные агарозные гели в *трис*-ацетатном ЭДТА-буфере.

Блоттинг-гибридизация по Саузерну. Блоттинг-гибридизацию осуществляли так, как описано Саузерном [11].

Ник-трансляция. Ник-трансляцию осуществляли, как описано ранее [10].

Гибридизация колоний. Гибридизация колоний была описана Грунстайном и Хогнессом [6].

Рестрикционный анализ и лигирование. Реакции проводили согласно рекомендациям поставщиков.

Электроэлюция ДНК с агарозных гелей. ДНК выделяли из агарозных гелей посредством электроэлюции в диализных мешочках, как описано ранее [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Введение транспозона Tn5 в клетки *P. solanacearum* и выделение мутантов

Km^R-Эксконъюганты после скрещивания NB101 (pJB4JI) × *P. solanacearum* Ps82 Rif^R появлялись с частотой 5×10^{-7} . Свыше 800 колоний было очищено и испытано на рост на средах CPG Gm, TZC-CPG и на минимальной среде АВ. Способность стабильно поддерживать плазмиду pJB4JI сохранил 1 % Km^R-эксконъюгантов. После проверки этих штаммов мы убедились, что они содержат интактную плазмиду pJB4JI. Эти штаммы обладали также способностью переносить указанную плазмиду обратно в *E. coli* (данные не представлены). Около 0,5 % Km^R-эксконъюгантов были не способны расти на минимальной среде и потому они исключены из дальнейшего анализа. Примерно 1 % Km^R-эксконъюгантов были не способны продуцировать ВПС, что можно было видеть по их росту на среде TZC. Такие колонии тестировали на вирулентность путем инокуляции ими восприимчивого сорта картофеля Russett Burbank. Все тестированные нефлюидальные колонии были авирулентными.

Физическая характеристика Tn5-вставок

Чтобы убедиться в том, что Tn5 присутствуют в геноме *P. solanacearum*, выполняли блоттинг-гибридизацию по Саузерну для нескольких случайно выбранных эксконъюгантов Km^R Gm^S. На рисунке 39.1 показана гибридизация ник-транслированной пробной pRZ102 с суммарной EcoRI-расщепленной геномной ДНК *P. solanacearum*.

Различия в подвижности полос, дающих гибридизацию, показывают, что Tn5 внедряется в единичные случайные сайты, разбросанные по всему геному (дорожки В—Н). На дорожке А представлена ДНК дикого типа, из которой видно отсутствие гомологии между pRZ102 и *P. solanacearum*.

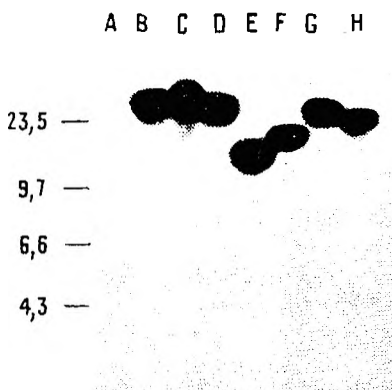


Рис. 39.1

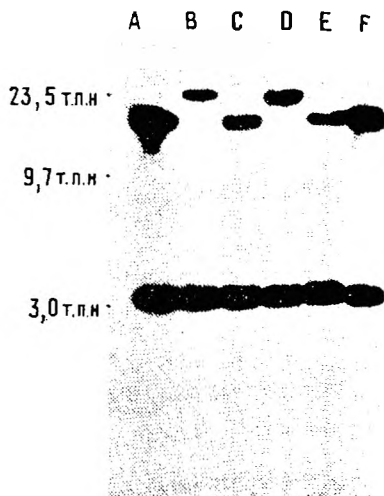


Рис. 39.2

Рис. 39.1. Блоттинг-гибридизация по Саузерну случайно выбранных флюидальных $Km^R Gm^S$ -эксонъюгантов. Суммарную ДНК расщепляли ферментом *EcoRI*, переносили на нитроцеллюлозу после электрофореза и гибридовали с ник-транслированной пробой рRZ102. ДНК дикого типа представлена на дорожке А. На дорожках В—Н представлена ДНК семи случайно выбранных флюидальных $Km^R Gm^S$ -эксонъюгантов.

Рис. 39.2. Блоттинг-гибридизация по Саузерну нефлюидальных авирулентных $Km^R Gm^S$ -мутантов. Суммарную ДНК шести нефлюидальных мутантов расщепляли *EcoRI*, переносили на нитроцеллюлозу после электрофореза и гибридовали с ник-транслированной рRZ102:
дорожка А — Ps82-18; В — Ps82-316; С — Ps82-305; D — Ps82-303; E — Ps82-293; F — Ps82-497.

Затем мы выделили ДНК из шести независимых нефлюидальных эксонъюгантов $Km^R Gm^S$ и провели полное расщепление ее рестриктазой *EcoRI*. На рисунке 39.2 показан характер гибридации с пробой рRZ102. Каждый изолят содержал две полосы, которые гибридизуются с данной пробой. Одну полосу более 5,7 т. п. н. (размер, соответствующий наличию целого элемента Tn5) и общую полосу (<5,7 т. п. н.) с подвижностью 3 т. п. н. Поскольку было показано, что транспозоны IS50L и IS50R расположены на краях Tn5 [1], мы предположили, что в указанных изолятах IS50 транспонируется независимо и генетически связан с нефлюидальным фенотипом.

Клонирование IS50-вставок из *P. solanasearum*

Чтобы показать, что транспозон IS50 встроился в геном *P. solanasearum* независимо, суммарная ДНК (10 мкг) из двух неза-

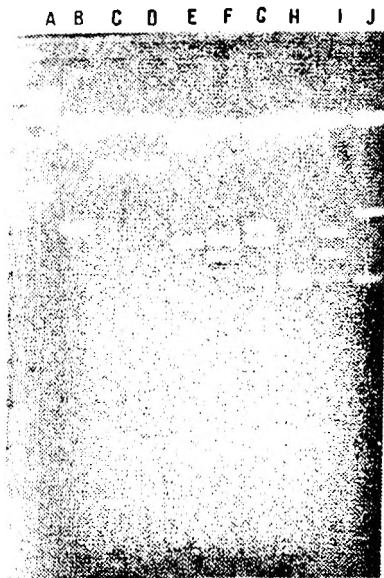


Рис. 39.3. Электрофорез в агарозном геле вставок IS50, клонированных из генома *P. solanacearum*: дорожка А — *Hind*III-расщепление фага λ ; В — *Eco*RI-расщепленная рPsDDMS1; С — *Eco*RI-расщепленная рPsDDMS18; D — *Eco*RI-расщепленная рPsDDMS316; E — *Eco*RI- и *Pst*I-расщепленная рPsDDMS1; F — *Eco*RI и *Pst*I-расщепленная рPsDDMS18; G — *Eco*RI- и *Pst*I-расщепленная рPsDDMS316; H — *Eco*RI- и *Xho*I-расщепленная рPsDDMS1; I — *Eco*RI и *Xho*I-расщепленная рPsDDMS18; J — *Eco*RI- и *Xho*I-расщепленная рPsDDMS316

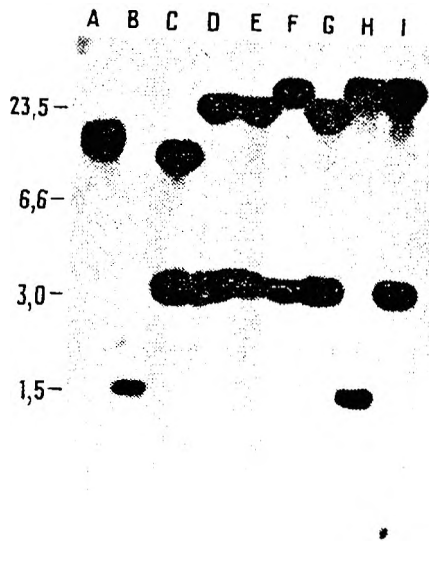


Рис. 39.4. Подтверждение независимых вставок Tn5 и IS50 в геном *P. solanacearum*. Суммарную ДНК нефлюидальных мутантов расщепляли *Eco*RI, переносили на нитроцеллюлозу после электрофореза и гибридизовали с пробой рPsDDMS316: дорожка А — нерасщепленная ДНК плазмиды рPsDDMS316; В — ДНК дикого типа; С — Ps82-2NR; D — Ps82-18; E — Ps82-293; F — Ps82-303; G — Ps82-305; H — Ps82-316FR; I — Ps82-316.

A B C D E F G H I



Рис. 39.5. Блоттинг-гибридизация по Саузерну IS50-вставок в общем фрагменте 1,5 т. п. н. *P. solanacearum*. Дорожка А — *Eco*RI-расщепленная рPsDDMS1; на дорожках В—Н представлена суммарная *Eco*RI-расщепленная ДНК плазмид Ps82R, Ps82-2NR, Ps82-18, Ps82-293, Ps82-303, Ps82-305, Ps82-316, Ps82-497. Для гибридизации брали ник-транслированную пробу рPsDDMS1.

висимых нефлюидальных мутантов была расщеплена *EcoRI* и подвергнута электрофорезу в 0,7 %-ной агарозе. Была выделена суммарная ДНК с подвижностью 2,5—3,5 т. п. н. и электрооблуживана из агарозы. Эта ДНК была затем вставлена с помощью лигирования в единственный *EcoRI*-сайт плазмиды pBR325 и внесена с помощью трансформации и отбора по Amp^r и Tc в *E. coli* HB101. Отдельные трансформанты были очищены и проверены по признаку Cm^s. Колонии Amp^rTc^rCm^s были лизированы на фильтрах, и их ДНК перенесена на нитроцеллюлозные фильтры, на которых она была подвергнута гибридизации с ник-транслированной пробной ДНК pRZ102. Гибридирующие колонии были выделены и проанализированы на содержание плазмид (рис. 39.3). Рестриктивное картирование подтвердило присутствие транспозона IS50 в геноме *P. solanacearum* (данные не представлены). Чтобы проверить, что эти клоны действительно являются искомыми, pPsDDMS316 была ник-транслирована и использована в качестве пробы для гибридизации с *EcoRI*-расщепленной ДНК *P. solanacearum* дикого типа (дорожка В) и шести независимых мутантов (дорожки С—Г и I) (рис. 39.4). Эта блоттинг-гибридизация по Саузерну показала, что клон pPsDDMS316 состоит из элемента ДНК (IS50 1,5 т. п. н.), вставленного в единичный *EcoRI*-фрагмент ДНК *P. solanacearum* (1,5 т. п. н.). Кроме того, указанная проба гибридизуется с интактным Tn5-элементом и также показывает, что все IS50-вставки локализованы в общем *EcoRI*-фрагменте 1,5 т. п. н. ДНК *P. solanacearum*.

Клон pPsDDMS316 был затем использован в качестве пробы для выделения соответствующего *EcoRI*-фрагмента дикого типа. Клонирование вели, как описано выше, с тем лишь отличием, что из агарозного геля электрооблуживали ДНК, соответствующую фрагменту 1,5 т. п. н. Был выделен клон (pPsDDMS1), который гибридизовался с пробой (pPsDDMS316). Присутствие фрагмента дикого типа было подтверждено с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 39.3).

Этот клон был затем использован в качестве пробы для гибридизации с ДНК дикого типа и ДНК из нефлюидальных мутантов (рис. 39.5). И вновь результаты соответствовали тому, что мы клонировали фрагмент дикого типа и что потеря вирулентности связана со вставкой, включенной в общий для всех мутантов фрагмент длиной 1,5 т. п. н.

Выщепление элемента IS50 восстанавливает синтез ВПС

Мы искали дальнейших подтверждений того, что IS50-элементы ведут к утрате вирулентности. У изолята PS82-316 наблюдались спонтанные ревертанты. Одна из таких колоний была очищена, из нее выделена ДНК и расщеплена *EcoRI*. На рисунке 39.3 показаны результаты гибридизации пробы pPsDDMS316 с суммарной *EcoRI*-расщепленной ДНК флюидального ревертанта Ps82-316FR (дорожка Н). Можно видеть, что полоса 3,0 т. п. н.

39.2. Перенос плазмид RSF1010 и pKT210 в клетки *P. solanacearum* плазмидой-помощником pRK2013

Донор	Реципиент	Отбор по:	Частота*
C600 (RSF1010)	Ps82R	Rif ^R , Sm ^R	5×10^{-4}
HB101 (pKT210)	Ps82R	Rif ^R , Sm ^R , Cm ^R	1×10^{-5}

* Частота выражена относительно донорных клеток.

исчезла и восстановился исходный размер фрагмента дикого типа (дорожка B).

Мобилизация клонирующих векторов, производных RSF1010, в *P. solanacearum* плазмидой-помощником pRK2013

Клонирующий вектор широкого круга хозяев RSF1010 и два его производных тестировали на способность реплицироваться в клетках *P. solanacearum*. Это осуществляли путем мобилизации RSF1010 и pKT210 плазмидой-помощником pRK2013. В таблице 39.2 представлены результаты таких экспериментов. Мини-анализы ДНК из этих изолятов также подтвердили присутствие указанных векторов в клетках *P. solanacearum* (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы показали, что как Tn5, так и IS50 могут быть использованы в качестве инсерционных элементов для получения мутантов *P. solanacearum*. Большинство Km^RGm^S-эксконъюгантов содержали лишь интактные Tn5-элементы. Только в случае нефлюидальных авирулентных мутантов мы наблюдали обе вставки — Tn5 и IS50. Это имело место более чем у 50 случайно выбранных Km^RGm^S-эксконъюгантов. Строгая корреляция встраивания независимых IS50-элементов в общий фрагмент генома *P. solanacearum* указывает на то, что этот участок ДНК контролирует некий этап синтеза ВПС. Дополнительным свидетельством в пользу этой гипотезы является, по-видимому, точное выщепление IS50 из данного фрагмента. В предварительных экспериментах обнаружено также, что и другие сайты в геноме *P. solanacearum* могут быть важны для детерминации флюидального фенотипа, поскольку мы обнаружили единичные Tn5-вставки в других локусах (Стаскавич и др., *неопубликованные наблюдения*). Буше (*личное сообщение*) также наблюдал Tn5-индуцированные мутанты по нескольким локусам, дающие начало нефлюидальному фенотипу. Окончательное доказательство того, что локус, расположенный в EcoRI-фрагменте 1,5 т. п. н., который мы описали, вовлечен в контроль вирулентности, получено с помощью сайт-направленного мутагенеза этого

локуса. Мы убедительно показали его роль как одного из, возможно, нескольких локусов, вовлеченных в контроль вирулентности у *P. solanacearum* (Стаскавич и др., 1983, готовится к печати).

Цишек и др. [12] показали, что раса 3 штамма *P. solanacearum* S-82 содержит мегаплазмиду с молекулярной массой свыше 300 МДа. Ведутся совместные эксперименты по выяснению того, локализован ли на этой мегаплазмиде locus, описанный нами. Сейчас мы создаем библиотеки на космидных клонирующих векторах, производных RSF1010, для выделения больших участков ДНК, охватывающих фрагмент 1,5 т. п. н., в попытках достигнуть комплементации наших мутаций. Такой подход должен облегчить выделение других генов, контролирующих вирулентность у *P. solanacearum*.

Благодарности. Выражаем признательность Н. Панопуло-су, П. Буастару и А. Эллингбоу за плодотворные идеи и предложения, сделанные при выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berg DE, Johnsrud L, McDivitt L, Ramabhadran R, Hirschel BJ (1982) Inverted repeats of Tn5 are transposable elements. PNAS 79:2632—2635
2. Boucher C, Message B, Debien D, Zischek C (1981) Use of P-1 incompatibility group plasmids to introduce transposons in *Pseudomonas solanacearum*. Phyto 71:639—642
3. Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu Rev Phytopathol 2:203—230
4. Chilton MD, Currier T, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. PNAS 71:3672—3676
5. Currier TC, Morgan MK (1981) Plasmids are not associated with formation of noncapsulated variants of *Pseudomonas solanacearum*. Proc 5th Int Conf Plant Pathol Bact, Cali, Colombia, pp 420—425
6. Grunstein M, Hogness D (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene. DNAS 72:3961
7. Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693—695
8. Kleckner N, Roth JR, Botstein D (1977) Genetic engineering in vivo using translocatable drugresistance elements. J Mol Biol 116:125
9. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning — a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab
10. Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 113:237
11. Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503
12. Zischek C, Tuyen LTK, Boistard P, Boucher C (1981) Presence of a megaplasmid in strains of *Pseudomonas solanacearum*. Proc 5th Int Conf Plant Pathol Bact, Cali, Columbia, pp 427—437

40. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕНТРОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛЬДА ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИЙ И В СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО ПИГМЕНТА (СИДЕРОФОРА)

*К. ОРСЕР**, *Б. СТАСКАВИЧ***, *ДЖ. ЛОПЕР**,
*Н. ПАНОПУЛОС**, *Д. ДАЛЬБЕК***, *С. ЛИНДОУ** и *М. ШРОТ**

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы взаимодействуют с растениями разнообразными путями, прямыми и косвенными. Прямые взаимодействия включают патогенность многих различных типов, а также симбиоз, наиболее изученным примером которого являются взаимоотношения ризобий с бобовыми растениями. Косвенные взаимодействия — это такие отношения, при которых индивидуальные микроорганизмы или их группы взаимодействуют с другими микроорганизмами, а те, в свою очередь, влияют на рост и здоровье растений. В эту категорию попадает также антагонизм и конкуренция микробов в ризосфере или филлоплане. Все из упомянутых типов взаимоотношений важны для сельского хозяйства. Наше знание молекулярных и генетических основ различных сторон таких взаимодействий или экологической выживаемости и конкурентоспособности микроорганизмов, участвующих в них, за небольшими исключениями, еще невелико. Выяснение сущности этих процессов существенно для отбора, создания и использования биологических агентов и способов борьбы с фитопатогенами и сорняками, а также для модификации микробных популяций в ризосфере или филлоплане в агрономических целях. В наших лабораториях ведутся исследования взаимоотношений растений с бактериями, в качестве объектов исследования выбраны несколько различных модельных бактерий, которые по отдельности или в совокупности удобны для изучения одного или более типов взаимодействий. В данной статье мы обсуждаем некоторые результаты проведенной недавно работы по клонированию генов, вовлеченных в образование центров кристаллизации льда и в синтез некоторыми фитопатогенными и эпифитными бактериями флуоресцирующего сидерофора.

* C. Orser, J. Loper, N. J. Panopoulos, S. E. Lindow, M. N. Schroth, Department of Plant Pathology, University of California, Berkeley, CA, USA.

** B. J. Staskawicz, D. Dahlbeck, International Plant Research Institute, San Carlos, CA 94070, USA.

ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕНТРОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛЬДА ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИЙ И ПОВРЕЖДЕНИЯ, НАНОСИМЫЕ РАСТЕНИЯМ МОРОЗОМ

Pseudomonas syringae Van Hall и *Erwinia herbicola* (Lohnis) Две вызывают кристаллизацию льда в переохлажденной воде при температуре немного ниже 0°C (пороговая температура кристаллизации около $-1,8^{\circ}\text{C}$). Первый из указанных видов включает штаммы, в настоящее время классифицируемые как патогенные [2] на различных растениях, тогда как *E. herbicola* не относится к фитопатогенам. Оба вида представляют растительные эпифиты, встречаемые в больших количествах на надземных поверхностях растений (листьях, стеблях, почках, цветках), с сезонными колебаниями от необнаружимого уровня до 10^7 клеток/г сырой массы ткани.

Установлена причинная взаимосвязь между повреждениями от заморозков у морозочувствительных растений при сравнительно небольших отрицательных температурах (до -5°C) и присутствием бактерий. Например, степень повреждения после выдерживания растений при низких температурах в поле или в контролируемых условиях (в ростовых камерах) прямо зависит от логарифма численности бактериальных популяций, активных в образовании центров кристаллизации льда (INA+ice nucleation activity), присутствующих в тканях или на поверхности надземных частей растений. Вместе с тем растения, выращенные в стерильных условиях, могут выдерживать температуру на несколько градусов ниже нуля (около -6°C) без видимых повреждений; однако они становятся чувствительными к таким температурам, если их опрыснуть суспензиями INA⁺-бактерий перед экспозицией при низких температурах [10, 13]. Способность вызывать кристаллизацию льда не только приводит к повреждениям при заморозках, но и считается условным зависимым от заморозков фактором вирулентности *P. syringae* pv. *syringae*. Действительно, несмотря на наличие значительных бактериальных популяций на поверхностях растений, болезнь часто возникает только после падения температуры окружающей среды до или ниже точки замерзания [17]. Считается, что образование центров кристаллизации льда под влиянием бактерий играет также важную роль в атмосферных явлениях — выпадении осадков и представляет практический интерес, например, для процесса искусственного образования снега (засева облаков).

Природа вещества (веществ), ответственного за кристаллизационную активность (INA) этих бактерий, неизвестна. Ясно, однако, что эта активность связана с бактериальными клетками (не выделяется в среду) и, по-видимому, локализована на их внешней мембране. В ее выражение, вероятно, вовлечены прямо или косвенно один или несколько белков. Мутанты, дефектные по кристаллизационной активности (INA⁻), были выделены, но подроб-

но не изучались [9]. Недавно нам удалось клонировать гены кристаллизации льда *P. syringae* и *E. herbicola* (Орсер и др., 1982, готовится к печати).

ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ПИГМЕНТЫ (СИДЕРОФОРЫ) *PSEUDOMONAS*

Синтез желто-зеленых, флуоресцирующих в УФ-свете водорастворимых пигментов является характерным таксономическим свойством флуоресцирующих псевдомонад, включая *P. syringae* pv. *syringae* [6]. На синтез этих пигментов влияют многие факторы окружающей среды, один из которых — низкое содержание железа. Регуляция уровнем железа и тот факт, что флуоресцирующий пигмент *P. fluorescens* образует очень стабильные комплексы с Fe^{3+} и повышает поглощение клетками ^{59}Fe [14], показывают, что эти вещества выполняют функцию сидерофоров. Недавно была установлена структура псевдобактина и желто-зеленого флуоресцирующего пигмента из *P. fluorescens* В-10, а также его роль в транспорте железа [21]. Псевдобактин, клетки *P. fluorescens* В-10 и некоторых других штаммов группы *P. fluorescens-putida* способствуют росту некоторых растений и контролируют рост определенных фитопатогенных микроорганизмов [5, 15, 18, 19].

Сидерофоры *P. syringae* химически не охарактеризованы. Наше наблюдение (неопубликованное) о том, что нефлуоресцирующие мутанты *P. s.* pv. *syringae* условно зависимы от железа, показало, что флуоресцирующий пигмент (пигменты) этой бактерии действует как сидерофор (сидерофоры). Участие флуоресцирующих сидерофоров во взаимодействиях микробов в ризосфере и способность *P. syringae* служить агентом биоконтроля [7, 20] побудили нас к изучению генетики синтеза флуоресцирующего пигмента у *P. s.* pv. *syringae*.

МЕТОДЫ

Конструирование геномных библиотек подробно описано в работе Орсера и др. [16]. Коротко оно заключается в следующем: суммарную ДНК из штаммов *P. s.* pv. *syringae* 31R1 и Cit7, а также штамма *E. herbicola* 26SR6-2 дважды очищали центрифугированием в градиенте плотности CsCl — бромистого этидия и диализовали в подходящих буферах. ДНК частично расщепляли *EcoRI* (0,3 единицы/мкг ДНК, 30 мин) и фракционировали центрифугированием в градиенте 5—25 %-ной нейтральной сахарозы. После анализа электрофорезом в агарозном геле собирали фракции, богатые фрагментами размером 18—25 т. п. н., осаждали этанолом и лигировали (ДНК-лигазой фага T4) с *EcoRI*-линеаризованным плазмидным вектором pLAFR1 [3]. Этот вектор является космидным производным вектора с широким кругом хозяев pRK290 (Tc^R) и содержит единственный *EcoRI*-сайт вне тетрациклинового гена. Чтобы свести к минимуму упаковку векторных димеров, соотношение фрагментов ДНК *P. syringae* к линеаризо-

ванному рLAFR1 в ходе реакции лигирования было 3—4 : 1. Смесь лигированной ДНК упаковывали в фаговые частицы *in vitro* и использовали для трансдукции клеток *E. coli* HB101, выращенных на мальтозе, к тетрациклин-устойчивости. Несколько сотен Тс^R-трансдуктантов индивидуально инокулировали в лунки стерильных чашек для микротитрования, содержащих 100 мкл на лунку В-бульона Кинга с добавками 15 мкг/мл тетрациклина (чтобы вести отбор на присутствие/поддержание вектора) и 100 мкг/мл стрептомицина и циклогексимида для предотвращения бактериального и грибного загрязнения. Чашки закрывали крышками и инкубировали в течение ночи при 37 °С. Затем в каждую лунку добавляли глицерин до конечной концентрации 30 %, что обеспечивало возможность длительного хранения бактерий при низкой температуре. Дубликат библиотек хранили в DMSO. Для получения рабочих копий или частей этих библиотек был сделан штамп из 48 проволочек из нержавеющей стали длиной 4 см, вставленных в отверстия в алюминиевой пластинке. Расположение проволочек точно соответствовало лункам в чашках для микротитрования. Такой штамп легко стерилизуется путем смачивания в спирте и обжигания над пламенем. Простерилизованный штамп вначале помещали в первую половину чашки для микротитрования так, чтобы проволочки погружались в лунки. После легкого взбалтывания штамп вынимали и погружали в соответствующую половину другой чашки, в которой содержались порции на 100 мкл бульона с добавкой антибиотика, как указано выше. Описанные процедуры повторяли, пока не переносили желаемое число колоний на набор чашек-копий. Все эти операции выполняли под ламинаром.

Рекомбинантные клоны, несущие представляющие интерес гены, идентифицировали либо путем прямого анализа колоний *E. coli* на выражение нужных генов, либо с помощью комплементационных тестов с подходящими мутантами штаммов — источников ДНК. Для тестов на комплементацию рекомбинантные плазмиды мобилизовали с помощью рRK2013 или из общей исходной смеси трансдуктантов, или из индивидуально хранящихся рекомбинантных колоний, или из частичных смесей в надлежащем образом маркированные мутанты реципиентных штаммов.

Для этой цели 50 мкл свежеразведенной суспензии клеток HB101 (рRK2013) и равный объем клеточной суспензии донора рекомбинантной плазмиды и ее реципиента смешивали в стерильных чашках для микротитрования и инкубировали в течение ночи. В альтернативном варианте из 50 мкл трехродительской клеточной смеси на лунку делали перенос в другие чашки, содержащие 200 мкл на лунку В-агара Кинга, для проведения скрещивания на твердом агаре, что обеспечивает значительно более высокую частоту переноса плазмид Р-группы. После инкубации в течение ночи в каждую лунку добавляли 50—100 мкл свежего В-бульона Кинга, чтобы ресуспендировать клетки, при необходимости готовили последовательные разведения. Небольшой объем (5—10 мкл)

таких клеточных суспензий переносили на соответствующие чашки с агаром. Чтобы облегчить поглощение жидкости агаром, чашки после заливки агаром оставляли с открытыми крышками и подсушивали под ламинаром или готовили за два дня до использования. Подобные переносы облегчались применением мультипетки Эппендорфа с восемью кончиками, которые позволяют производить восемь переносов одновременно (в один вертикальный ряд чашки для микротитрования).

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ, ИНДУЦИРУЮЩИХ КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ ЛЬДА, ИЗ *P. SYRINGAE*, *PV. SYRINGAE* И *E. HERBICOLA*

Степень сложности генетических и биохимических основ способности индуцировать центры кристаллизации льда у *P. syringae* и *E. herbicola* была неизвестна. Поэтому важно было обнаружить активность по индуцированию кристаллизации льда у клеток *E. coli*, использованных для создания геномных библиотек указанных бактерий. Приблизительно 0,3 % из нескольких сотен Tc^R-трансдуктантов, тестированных методом замораживания отпечатков [10, 11, 12], были INA-положительными. Дальнейший анализ выявил наличие в каждом таком клоне рекомбинантных плазмид, каждая из которых имела разный набор фрагментов, однако у всех имелся общий фрагмент длиной 21 т. п. н. (pLAFRR1) и один или более дополнительных фрагментов. Некоторые плазмиды впоследствии были перенесены в клетки *E. coli* HB101 и SK1592, а также в INA⁻-мутанты штаммов — источников ДНК (*P. syringae* и *E. herbicola*), полученных ранее [9]. Во всех случаях были получены INA⁺-потомки, все из которых несли плазмиды, идентичные по набору рестриктных фрагментов, плазмидам, присутствующим в донорных рекомбинантных клонах. Следовательно, изложенные результаты показывают, что клонированные вставки определяют выражение INA⁺-фенотипа как в гомологичных, так и в гетерологичных (*E. coli*) клетках.

Выражение признака INA у *P. syringae* и *E. herbicola* находится под температурным и временным контролем [13]. Для оптимального выражения этого признака клетки должны выращиваться при оптимальной температуре и тестироваться на поздних стадиях жизненного цикла. Даже при наилучших известных условиях роста в большинстве культур в любое данное время содержится лишь небольшая доля клеток с активными сайтами индуцирования кристаллизации льда. То же справедливо и в отношении как температуры выращивания (рис. 40.1 и 40.2), так и жизненного цикла клеток *E. coli*, несущих рекомбинантные INA⁺-плазмиды. Кроме того, спектры активности по индуцированию кристаллизации льда нескольких клонов *E. coli*, несущих рекомбинантные INA⁺-плазмиды, были в целом похожи на такие спектры штаммов — источников ДНК (рис. 40.3 и 40.4). Это показывает, что выражение признака INA у *E. coli* находится под аналогичным временным и температурным контролем и проявляется

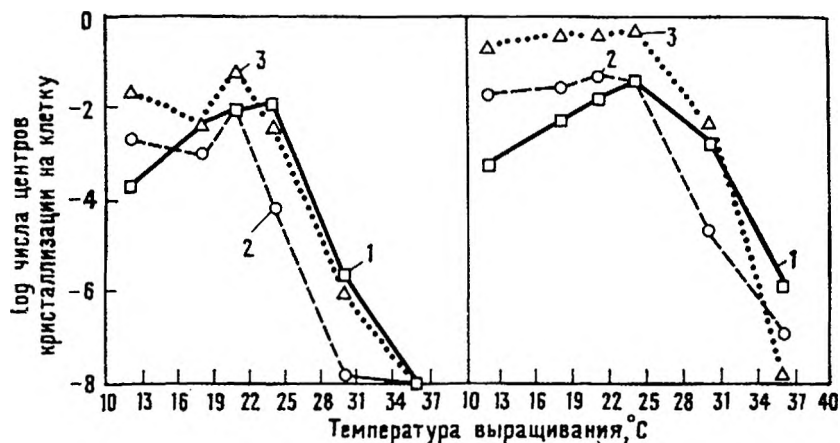


Рис. 40.1. Частота возникновения центров кристаллизации льда (логарифм числа центров кристаллизации на клетку) под влиянием клеток *P. s. syringae* Cit7 (1), *E. coli* HB101 (pC-1) (2) и HB101 (pC1BR1) (3), выращенных и тестированных при различных температурах. Испытания проводились при -5°C (левый график) или при -9°C (правый график).

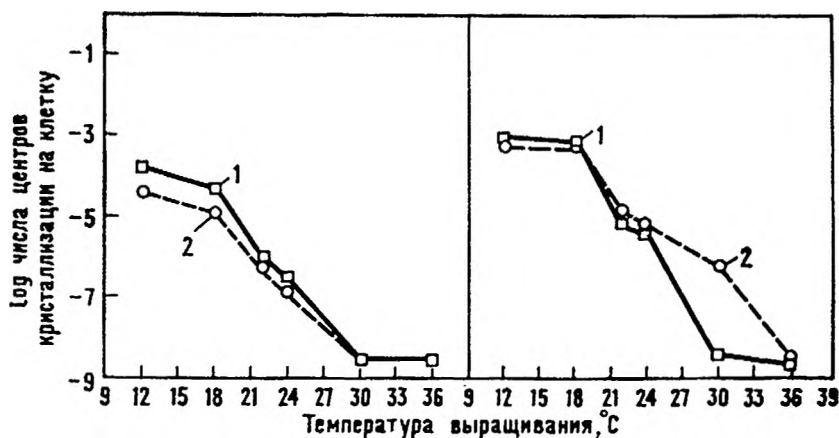


Рис. 40.2. Частота возникновения центров кристаллизации льда (логарифм числа центров кристаллизации на клетку) под влиянием клеток *E. herbicola* 26SR6-2 (1) и *E. coli* HB101 (pE-7) (2), выращенных и тестированных при различных температурах. Испытания проводились при -5°C (левый график) или при -9°C (правый график).

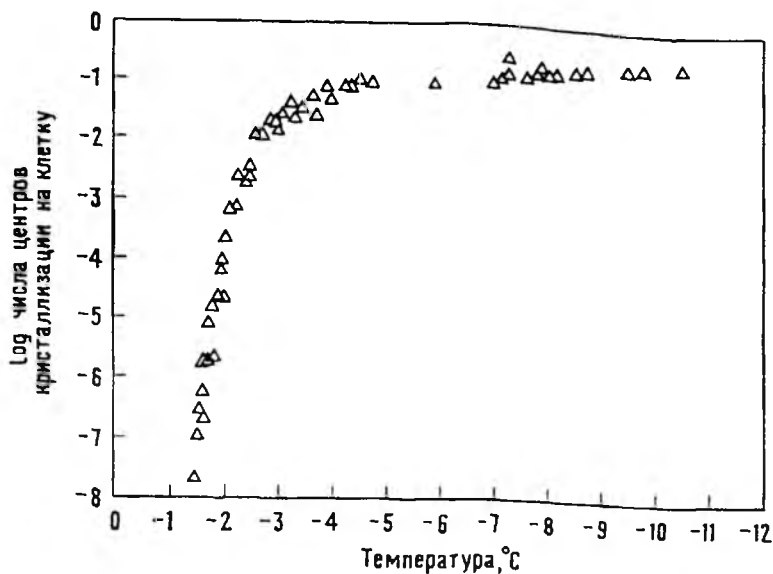


Рис. 40.3. Активность, инициирующая кристаллизацию льда у штамма *P. s. syringae* Cit7, как функция температуры (число центров кристаллизации на клетку) (ордината), отложенная относительно температуры в градусах С (абсцисса). Методы описаны в работе Линдоу [13].

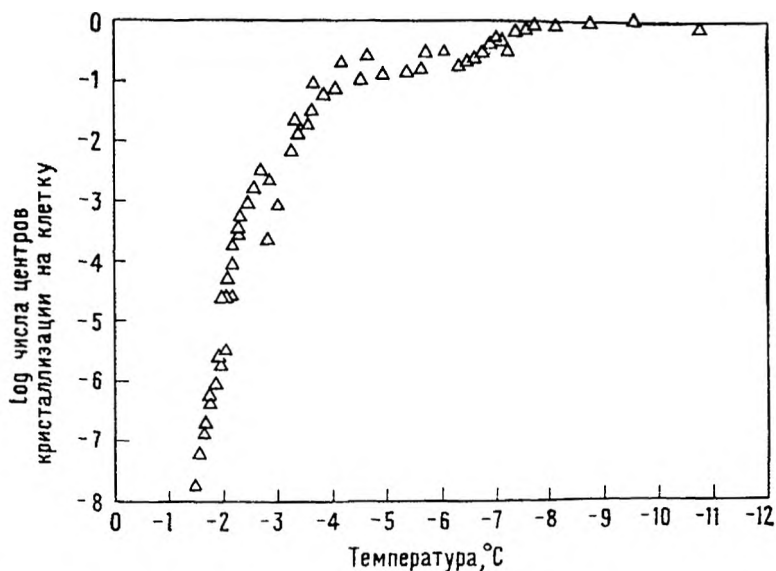


Рис. 40.4. Активность, инициирующая кристаллизацию льда у штамма *E. coli* HB101 (pC1BR1), как функция температуры. Параметры и измерения, как на рисунке 40.3.

при той же пороговой температуре индуцирования кристаллизации, что и у INA⁺-штаммов дикого типа.

Ввиду низкого уровня экспрессии признака INA у штаммов — источников ДНК и *E. coli* мы исследовали возможность использования плазмидного вектора с большим числом копий, чтобы повысить частоту индуцирования кристаллизации. (Число копий рLAFR1, хотя точно оно и неизвестно, считается низким; С. Лонг, личное сообщение.) Поэтому мы субклонировали INA-активные *EcoRI*-фрагменты из одной рекомбинантной плазмиды, рС-1, в рBR325. Отбор трансформантов *E. coli* HB101 производили на чашках с агаром, содержащих 100 мг/мл ампициллина + 100 мг/мл стрептомицина, и проверяли на чувствительность к хлорамфениколу. Несколько полученных таким путем Ст^s INA⁺-трансформантов содержали плазмиды с двумя *EcoRI*-фрагментами — один из них по размеру равен рBR325, а другой, длиной 10 т. п. н., соответствовал *EcoRI*-фрагменту рС-1 и предположительно нес область, ответственную за индуцирование кристаллизации льда. Трансформант, несущий одну такую плазмиду, обозначенную рС1BR1, сравнили по параметрам индуцирования кристаллизации со штаммом HB101 (рС-1) (рис. 40.1). Ясно, что у *E. coli* (рС1BR1) обнаружена гораздо более высокая частота индуцирования кристаллизации, чем у *E. coli* (рС-1), а также *P. syringae* и *E. herbicola*. В случае испытания при -9°C почти каждая клетка *E. coli* (рС1BR1) содержала активный центр кристаллизации. Пока неизвестно, отражает ли этот факт лишь возросшую дозу гена, ожидаемую у рекомбинантных плазмид рBR325, либо транскрипционное сквозное считывание с гена хлорамфениколацетилтрансферазы, в который вставлен INA-фрагмент 10 т. п. н., либо элиминацию элементов негативного контроля в ходе субклонирования с плазмиды рС-1.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА УФ-ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ И НЕЗАВИСИМЫЙ ОТ ЖЕЛЕЗА РОСТ P. SYRINGAE PV. SYRINGAE

Добавление к В-агару Кинга 200 млн⁻¹ Fe-хелатного соединения этилендиаминдигидроксибензилуксусной кислоты (ЭДДА) приводит к недостатку в среде железа. Клетки *P. syringae* pv. *syringae* 31R1 синтезируют сидерофор (сидерофоры), который может конкурировать с ЭДДА за ион железа, что позволяет штамму расти на этой среде. Нефлуоресцирующие мутанты этого штамма, полученные после ЭМС-мутагенеза (ЭМС — этилметансульфонат), не способны расти на этой среде. Подавление их роста обратимо при добавке к среде 10⁻⁴ М FeCl₃; следовательно, голодание по железу в самом деле обусловлено действием ЭДДА. Специфичность ЭДДА-хелатирования ионов железа обсуждена ранее [1]. Число и локализация генов, вовлеченных в синтез флуоресцирующего пигмента или в зависимый от железа рост *P. s. syringae*, не известны. Путем предварительной массовой проверки не удалось обнаружить флуоресцирующие в УФ-свете колонии *E. coli* при ис-

пользовании двух геномных библиотек *P. s. syringae*. Эта неудача может быть обусловлена одной из следующих причин: а) число генов, вовлеченных в синтез флуоресцирующего пигмента, у данных штаммов больше, чем кодирующая емкость клонированных вставок; б) эти гены в геноме *P. s. syringae* не сгруппированы; в) один или несколько из них не экспрессируются или их продукты летальны для клеток *E. coli* либо нестабильны в них.

При скрещиваниях нефлуоресцирующих мутантов с геномными библиотеками с низкой частотой возникали трансконъюганты, которые росли на средах с добавкой 200 мкг/мл ЭДДА. Однако неоднократные попытки выделить рекомбинантную плазмидную ДНК из этих трансконъюгантов к успеху не привели. Поэтому были проведены 718 отдельных трехродительских конъюгаций, донорами в которых служили индивидуальные клоны библиотеки НВ101 (pLAFR1-*P. syringae*-31R), хранящиеся в чашках для микротитрования, а реципиентами — НВ101 (pRK2013) и нефлуоресцирующие мутанты *P. syringae*. В двух из 718 отдельных скрещиваний появилось лишь небольшое число трансконъюгантов, которые обладали флуоресценцией и не зависели от железа. Однако и в этом случае неоднократные попытки выделить рекомбинантную плазмидную ДНК из трансконъюгантов к успеху не привели. Мы предполагаем, что последовательности ДНК, содержащиеся в двух указанных выше рекомбинантных плазидах, включают лишь часть информации, определяющей путь биосинтеза флуоресцирующего пигмента (сидерофора), или же у них отсутствуют действующие в *цис*-положении элементы экспрессии, так что для наблюдения комплементации у этих мутантов необходима интеграция этих элементов в хромосому реципиентного штамма за счет единичных кроссинговеров, опосредованных *гес*-системой. Тем не менее из донорных клонов НВ101 рекомбинантные плазмиды были выделены. Рестрикционный анализ этих плазмид показал, что структурно они идентичны и, по-видимому, являются дубликатными клонами. Впоследствии было показано, что одна из этих плазмид комплементирует еще несколько нефлуоресцирующих мутантов, но не способна комплементировать другие мутанты; это свидетельствует о том, что она *цсет* лишь некоторые гены, вовлеченные в синтез флуоресцирующего пигмента (сидерофора) у *P. s. syringae*. Позднее было получено несколько дополнительных рекомбинантных плазмид, которые комплементируют другие нефлуоресцирующие мутанты этой бактерии.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что последовательности ДНК, ответственные за активность, инициирующую кристаллизацию льда у *P. s. syringae* и *E. herbicola*, содержатся в небольшой области генома и поэтому легко поддаются клонированию. Кроме того, они хорошо экспрессируются в бактерии *E. coli*, в норме лишенной этой активности. Хотя в настоящее время число генов, необходимое для выражения

признака INA в *E. coli*, неизвестно, данные, полученные путем субклонирования, а также делеционного и инсерционного мутагенеза, указывают на то, что генетическая область, необходимая для кодирования INA в *E. coli*, равна 4—5 т. п. н. В настоящее время ведутся работы по переносу INA⁺-вставок в другие векторы для экспрессии с целью выделения и описания генных продуктов, участвующих в выражении признака INA, и создания высокоактивных культур и, возможно, внеклеточных продуктов, обладающих активностью, инициирующей кристаллизацию льда, для коммерческих целей.

Выделение рекомбинантных плазмид, вовлеченных в синтез флуоресцирующего пигмента (сидерофора) *P. s. syringae*, является первым шагом в изучении этого свойства и выяснении его значения для фундаментальной биологии этой и других подобных бактерий, ассоциированных с растениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archibald FS, Voe IW De (1980). *Infect Immunol* 27:322—344
2. Dye DW, Bradbury JF, Gota M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN (1980). *Rev Plant Pathol* 59:153—168
3. Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium mutants*. *Gene* (in press)
4. Kloepper JW, Schroth MN (1981). *Phytopathology* 71:1020—1023
5. Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980). *Nature* 286:885—886
6. Leisinger T, Margraff R (1979). *Microbiol Rev* 43:422—442
7. Lindow SE (1982a) Population dynamics of epiphytic ice nucleation positive bacteria on frostsensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: Sakai A, Li PH (eds) *Plant cold hardiness*. Academic Press, London New York
8. Lindow SE (1982b) Alternate methods of frost control through control of epiphytic ice nucleation active bacteria. *Plant Dis* 66 (in press)
9. Lindow SE, Staskawicz BJ (1981). *Phytopathology Abstr* 71:237
10. Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1978a) The role of bacterial ice nucle in frost injury to sensitive plants. In: Sakai A, Li PH (eds) *Plant cold hardiness*. Academic Press London New York
11. Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1978b). *Appl Environ Microbiol* 20:6446—6457
12. Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1978c). *Appl Environ Microbiol* 36:831—838
13. Lindow SE, Hirano SS, Borchet WR, Arny DC, Upper CD (1982). *Plant Physiol* 70:1090—1093
14. Meyer JM, Hornsperger JM (1978). *J Gen Microbiol* 107:329—331
15. Misaghi IJ, Stowell LS, Grogan RG, Spearman LC (1982). *Phytopathology* 72:33—36
16. Orser CS, Staskawicz BJ, Panopoulos NJ, Dahlbeck D, Lindow SE (1982). *Phytopathology* 72:1000
17. Panagopoulos CG, Crosse JE (1964). *Nature* 202:1352—1355
18. Scher FM, Baker R (1982) Induction of suppressiveness in soil to *Fusarium wilt* pathogens with *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelate. *Phytopathology* (in press)
19. Schroth MN, Hancock JG (1982). *Science* 216:1376—1381
20. Strobel GA (1981). *Phytopathology* 71:1007
21. Teintze M, Hossain MB, Barnes CL, Leong J, Helm D van der (1981). *Biochemistry* 20:6446—6457

41. ГЕНЕТИКА ВИРУЛЕНТНОСТИ И СИНТЕЗА ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ *PSEUDOMONAS SAVASTANOI*

Л. КОМАИ и Т. КОСУГЕ*

ВВЕДЕНИЕ

Бактерия *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Stevens является патогеном для растений маслины (*Olea europea*) и олеандра (*Nerium oleander*). Симптомы поражения, индуцируемые на растении-хозяине, представляют собой опухолевые наросты, называемые узлами или галлами, которые внешне похожи на симптомы болезни корончатый галл, хотя в основе ее лежит другой механизм. Пока нет данных, свидетельствующих о том, что опухоли, индуцируемые *P. savastanoi*, как и в случае агробактерий, являются результатом генетической трансформации клеток хозяина (Уилсон и Косуге, *неопубликованные данные*). На основе имеющейся информации можно заключить, что за развитие симптомов болезни ответственны главным образом фитогормоны, синтезируемые бактерией. В культуре клетки *P. savastanoi* продуцируют индолилуксусную кислоту (ИУК) и цитокинины — важные гормоны растений. В настоящей статье суммированы некоторые полученные нами результаты о молекулярной организации генов, управляющих синтезом ИУК, в геноме *P. savastanoi*.

Путь биосинтеза ИУК включает окислительное декарбоксилирование L-триптофана до индолацетамида ферментом триптофан-2-монооксигеназой и гидролиз этого амида индолацетамидгидролазой с образованием ИУК. Было установлено [5], что отбор клеток на устойчивость к α -метилтриптофану приводит к появлению мутантов, не способных синтезировать ИУК. При инокуляции растений олеандра такими мутантами они размножаются в растительной ткани, не индуцируя галлов.

ГЕНЕТИКА СИНТЕЗА ИУК

К изучению генетики приступили с выяснения того, располагаются ли гены, кодирующие биосинтетические ферменты, на плазмиде. Такая возможность казалась вероятной, поскольку штаммы *P. savastanoi* содержат от двух до семи видов плазмидной ДНК, а также потому, что у рода *Pseudomonas* необычные катаболические функции часто детерминируются плазмидами. Именно так обстоит дело в случае штамма EW2009: обработка акридиновым оранжевым привела к утрате способности синтезировать ИУК, что

* L. Comai and T. Kosuge, Department of Plant Pathology, University of California, Davis, CA 95616, USA.

коррелировало с потерей плазмиды с молекулярной массой 53 т. п. н., названной рIAA1. Путем совместной трансформации с RSF1010, небольшим R-фактором с широким кругом хозяев, рIAA1 была вновь внесена в вылеченные производные EW2009, что привело к восстановлению синтеза ИУК [1]. Дальнейшее изучение рIAA1 позволило точно картировать гены ИУК. Как показало молекулярное клонирование этого фрагмента в *E. coli* и транспозонный мутагенез, локус *iaaM*, кодирующий триптофан-2-монооксигеназу, содержится в *EcoRI*-фрагменте 2,7 т. п. н., названном *EcoRI-M*. Локус, кодирующий индолацетамидгидролазу, названный *iaaH*, локализован дистально относительно промотора от *iaaM*; вставка элементов, вызывающих полярные мутации, в *iaaM* предотвращает выражение гена гидролазы [3]. Следовательно, гены синтеза ИУК составляют часть оперона, находящегося в штамме EW2009 на плазмиде.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ СИНТЕЗА ИУК В РАЗНЫХ ШТАММАХ

Из инфицированных олеандра и маслины были выделены многие штаммы *P. savastanoi*. На основе специфичности в отношении хозяев изоляты можно разделить на олеандр-специфичные и маслино-специфичные. Штаммы, выделенные из олеандра, способны вызывать симптомы болезни как на олеандре, так и на маслине, тогда как штаммы, изолированные из маслины, патогенны, по-видимому, только для маслины. Кроме того, способность метаболизировать сахарозу характерна для штаммов, изолированных из олеандра, но не из маслины [7].

Мы задались целью выяснить, располагаются ли гены синтеза ИУК на плазмиде только у вида *P. savastanoi*. Для этого мы осуществили массовую проверку ряда изолятов с помощью следующих двух приемов. Во-первых, для каждого штамма были выделены мутанты, дефектные по синтезу ИУК, с помощью отбора α -метилтриптофаном. Поскольку у EW2009 такие мутанты обычно теряют рIAA1, мы сравнили для каждого штамма профиль плазмидной ДНК у родителя и его мутантных производных. Во-вторых, используя клонированный ген триптофан-2-монооксигеназы в качестве гибридизационной пробы, мы тестировали препараты плазмидной и хромосомной ДНК на наличие гомологичных последовательностей. Результаты этих двух подходов хорошо коррелировали между собой. В тех случаях, когда обнаруживалась делеция или утрата плазмиды у *Iaa*-мутантов, проба указывала на локализацию локуса *iaaM* на плазмиде. Наоборот, если у *Iaa*-мутантов не наблюдалось изменений в составе плазмидной ДНК, гомологичные последовательности были локализованы на хромосоме. У других олеандровых штаммов в дополнение к рIAA1 были найдены две новые плазмиды, рIAA2 и рIAA3, несущие гены синтеза ИУК [2]. По данным предварительных экспериментов, эти плазмиды и рIAA1 обнаруживают гомологию ДНК в области генов ИУК длиной не менее 6 т. п. н. Результаты опытов по гибри-

дизации с хромосомными генами ИУК показывают, что они не являются результатом интеграции целой рІААІ (Комаи и Косуге, *неопубликованные результаты*). В настоящее время исследуется механизм, вызвавший такое разнообразие локализации генов синтеза ИУК. Любопытно, однако, что подразделение штаммов, обнаруженное по критерию специфичности в отношении хозяев, коррелирует с молекулярной локализацией генов синтеза ИУК.

СИНТЕЗ ИУК И ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Получено много данных о взаимосвязи между синтезом ИУК и вирулентностью о том, что синтез ИУК необходим для проявления вирулентности. Во-первых, все тестированные Іаа⁻-мутанты были авирулентными на олеандре независимо от того, было ли вызвано прекращение синтеза ИУК утратой плазмидной ДНК, делециями или транспозициями ДНК в области генов синтеза ИУК. Во-вторых, способность вызывать симптомы болезни на растениях восстанавливалась у Іаа⁻-мутантов внесением плазмиды рІААІ или плазмиды широкого круга хозяев, несущей локус *іааМ* (Комаи и Косуге, *неопубликованные результаты*, Сурико и др., *неопубликованные данные*).

ИНСЕРЦИОННЫЙ ЭЛЕМЕНТ IS-51

Инсерционный элемент размером 1,3 т. п. н., получивший название IS-51, был обнаружен в локусе *іааМ* у спонтанных Іаа⁻-мутантов штамма EW2009. Этот элемент вызывал полярные эффекты у данных мутантов, так как он не только инактивировал *іааМ*, но и предотвращал выражение локуса *іааН*. Он был клонирован в *E. coli* и охарактеризован физически и генетически. С помощью опытов по гибридизации было найдено семейство повторяющихся элементов, высокомолекулярных IS-51, рассеянных по геному у разных штаммов с числом копий не менее 20. Полярный эффект, проявляемый этим элементом у *P. savastanoi*, был подтвержден в опытах с *E. coli*, у которой IS-51 терминирует транскрипцию [3].

ЭВОЛЮЦИЯ СИНТЕЗА ИУК

Происхождение генов синтеза ИУК остается неизвестным. Правдоподобно предположение, что эти гены поддерживаются у вида *P. savastanoi*, поскольку они обеспечивают ему селективное преимущество в природе. Основы такого селективного преимущества подробно не исследовались, но, исходя из ряда наблюдений, можно сделать следующие выводы. *P. savastanoi* не нуждается в генах синтеза ИУК для сосуществования с хозяином, поскольку Іаа⁻-мутанты могут расти и поддерживать жизнеспособность в тканях хозяина не менее 14 дней [5]. Однако штаммы дикого типа стимулируют аномальную пролиферацию клеток хозяина, об-

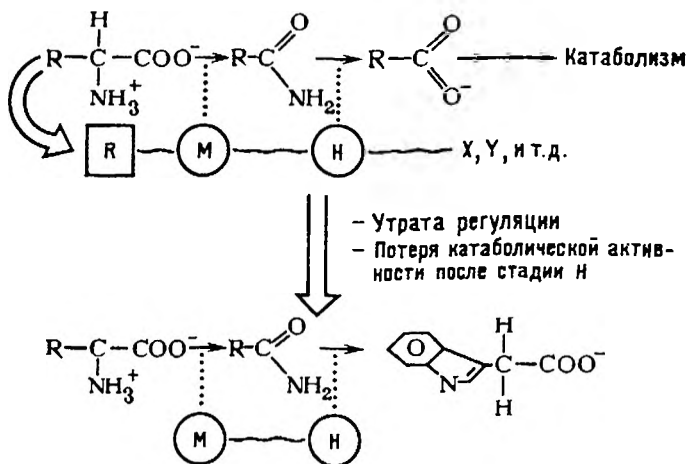


Рис. 41.1. Превращение гипотетичного пути катаболизма триптофана в путь биосинтеза индолилуксусной кислоты (ИУК). Катаболический оперон (*вверху*) состоит из генов *M* (ген монооксигеназы), *H* (ген гидролазы), *X*, *Y* и т. д. (неидентифицированные локусы катаболизма). ИУК синтезируется этой системой, только если триптофан присутствует в больших количествах, поскольку регуляторный локус (*R*) кодирует репрессор, инактивируемый триптофаном. Вместе с тем ИУК накапливаться не может, так как она катаболизируется дальше продуктом катаболического локуса *X*. Нужны лишь две мутации, приводящие к утрате локусов *R* и *X*, чтобы эта гипотетическая катаболическая система превратилась в путь биосинтеза ИУК, показанный *внизу*.

разующих узел. Такая структура интенсивно колонизируется клетками *P. savastanoi*, причем общая популяция клеток в ней достигает большой численности. Таким образом, если на ранних этапах после инфекции рост клеток дикого типа и мутантных примерно одинаков, то в дальнейшем мутанты не способны стимулировать образование специализированной ниши в виде опухоли и их общее число остается ограниченным. Растения, инокулированные *Iaa*⁻ мутантами, не проявляют почти никаких симптомов болезни. Синтез ИУК (и, возможно, цитокининов) может быть необходим для создания специализированной ниши, в которой патоген размножается и переживает периоды неблагоприятных климатических условий.

Согласно этой гипотезе, приобретение *P. savastanoi* системы синтеза ИУК представляет шаг от слабого и ограниченного состояния паразитизма к более вирулентному и успешному. Но откуда происходят гены синтеза ИУК? Следующая гипотеза основана на данных по энзимологии и генетике синтеза ИУК и на обширной информации об энзимологии и генетике катаболических путей у сапрофитных псевдомонад. Охарактеризована группа путей катаболизма L-аминокислот [6]. Эти пути дерепрессируются в присутствии субстрата (например, лизина) и состоят из ряда ферментативных этапов, первые из которых катализируются мо-

нооксигеназой и гидролазой, функционально сходными с ферментами, участвующими в синтезе ИУК из L-триптофана. Хотя система катаболизма L-триптофана не охарактеризована (если вообще существует), она вполне может быть предшественницей системы синтеза ИУК. Переход от катаболизма триптофана к синтезу ИУК мог быть достигнут двумя простыми мутациями: первая из них приводит к конститутивному синтезу, а вторая вызывает накопление ИУК путем элиминации системы распада ИУК (рис. 41.1).

Согласно этой теории, гены вирулентности произошли от генов сапрофитного роста при селективном давлении состояния паразитизма. Хотя эта теория не противоречит ограниченной информации на данную тему, она нуждается в экспериментальном доказательстве.

Благодарности. Данная работа субсидировалась Национальным научным фондом и Бюро по финансированию конкурентных исследований (США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Comai L, Kosuge T (1980) Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. J Bacteriol 143:950—957
2. Comai L, Kosuge T (1982) Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. J Bacteriol 149:40—46
3. Comai L, Kosuge T (1983) Transposable element that causes mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. J Bacteriol 154:1162—1167
4. Comai L, Surico G, Kosuge T (1982) Relation of plasmid DNA to indoleacetic acid production in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. J Gen Microbiol 128:2157—2163
5. Smidt M, Kosuge T (1979) The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha-methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. Physiol Plant Pathol 13:203—214
6. Takeda H, Hayaishi O (1966) Crystalline L-lysine oxygenase. J Biol Chem 241:2733—2736
7. Wilson E, Heskett MG, Johnson ML, Kosuge T (1972) Metabolic behavior of *Pseudomonas savastanoi* isolates from olive and oleander on certain carbohydrate and amino substrates. Phytopathology 62:349—355

42. ГЕНЕТИКА AZOSPIRILLUM

К. ЭЛЬМЕРИХ*

ВВЕДЕНИЕ

Азотфиксирующие спириллоподобные бактерии обычно ассоциированы с корнями травянистых растений [6, 7]. Их таксономический статус со временем изменялся. Вначале их называли *Azotobacter spirillum*, впоследствии они получили наименование *Spirillum lipoferum* [3], наконец, был введен новый род *Azospirillum* [42]. На основе процентного содержания пар GC, гомологии ДНК и пищевых потребностей разделяют два вида: *A. brasilense* и *A. lipoferum*.

ПИЩЕВЫЕ ПОТРЕБНОСТИ

A. brasilense и *A. lipoferum* — это строгие аэробы, имеющие скрученную палочковидную форму и содержащие глобулы поли- β -оксибутирата. Они могут использовать органические кислоты, такие, как молочная и янтарная, в качестве единственного источника углерода. Кроме того, *A. lipoferum* утилизирует ряд углеводов, включая глюкозу, и нуждается в биотине [33, 42]. Недавно появились сообщения об автотрофии и метилотрофии этих двух видов [39]. В качестве источников азота они могут использовать N_2 , NH_4^+ и NO_3^- . Однако для фиксации азота им необходимы микроаэробные условия [33, 34]. Некоторые штаммы этих видов обнаруживают анаэробный рост, используя NO_3^- в качестве конечного акцептора электронов [31, 32].

ПЛАЗМИДЫ

Характеристика

Плазмиды были охарактеризованы по электрофоретической подвижности в агарозном геле клеточных лизатов, полученных различными методами [10, 13, 28]. Все обследованные штаммы *Azospirillum* содержат, по крайней мере, одну плазмиду, а некоторые — до шести видов молекул, размер которых варьирует от 4×10^6 до более 300×10^6 [17, 24, 41, 43]. Есть расхождения в числе плазмид, обнаруженных в некоторых штаммах разными авторами. Например, Сингх и Венцель [41] нашли три плазмиды размером 5,4, 12 и 51 т. п. н. в штамме ATCC29709, тогда как Франш

* C. Elmerich, Unité de Physiologie Cellulaire, Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France.

и Эльмерих [17] обнаружили в этом штамме одну большую плазмиду с молекулярной массой около 200×10^6 . Не ясно, обусловлено ли это несоответствие нестабильностью плазмид, артефактами методик или ошибкой в названии штамма.

Фенотипы, связанные с плазмидами

Каких-либо данных об автотрансмиссивности плазмид пока нет. Описана спонтанная утрата плазмид [17] и исцеление от некоторых плазмид с помощью теплового воздействия и акридинового оранжевого [24, 43]. Сообщалось о фенотипических изменениях, сопровождающих потерю плазмид [24, 43]. Однако не описано каких-либо специфических признаков, определяемых плазмидами. Тем не менее можно предполагать существование некоторых функций, детерминируемых плазмидами, таких, как контроль утилизации источника азота [24], устойчивость к тяжелым металлам [43], синтез фитогормонов, специфичность или узнавание растения-хозяина, фиксация азота и т. д.

ФАГИ

Образование фагоподобных частиц

Используя митомицин С в качестве индуцирующего агента, мы наблюдали лизис клеток большинства обследованных штаммов *A. brasilense* и *A. lipoferum* [15, 17]. Ни один из лизатов не вызывал образования стерильных пятен у какого-либо штамма. Из клеток *A. brasilense* Sp7 (ATCC29145) был выделен дефектный фаг.

Очищенные частицы были лишены ДНК [17].

Бактериофаги, образующие стерильные пятна

Несколько групп исследователей пытались выделить фаги, но, насколько мне известно, они были изолированы только в Бразилии. Фаг, способный формировать стерильные пятна на *A. brasilense* Sp7, был описан, но не охарактеризован [19]. Недавно охарактеризован умеренный фаг, образующий стерильные пятна на *A. lipoferum* Bg17 (ATCC29709) [15]. Фаг, выделенный в лаборатории Деберайнера, был назван А1-1. По морфологии и размеру он сходен с колифагом λ и содержит молекулу двунитевой линейной ДНК 36 т. п. н. с липкими концами. Получены стабильные лизогены и установлено, что ДНК профага поддерживается в виде плазмиды. Круг хозяев фага ограничен немногими штаммами *A. brasilense* и *A. lipoferum* бразильского происхождения. Трансдуцирующая способность фага пока не установлена.

ВЫДЕЛЕНИЕ МУТАНТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН

Выделение мутантов

Классические методы мутагенеза, описанные ранее для *E. coli* [29], такие, как УФ-облучение или обработка химическими мутагенами (этилметансульфонатом, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином) с последующим обогащением мутантов пенициллином или D-цикloserином, можно с успехом применять на *Azospirillum*.

Сообщалось о выделении мутантов, дефектных по различным функциям, например ауксотрофов [18, 35, 43], мутантов, устойчивых к антибиотикам и антиметаболитам [2, 18, 22, 23, 30], мутантов по азотному метаболизму [1, 2, 20, 27], фиксация азота [25].

В *Azospirillum* вносили также профаг Mu [8] и транспозон Tn5 [4] с помощью плазмид группы IncP [11] в качестве векторов. Размножение Mu в клетках *Azospirillum* не обнаружено [16, 40]. Плаزمид-самоубийца pJB4JI (IncP, Mu, Gm, Tn5), использованная Беринджером и др. [5] для внедрения Tn5 в хромосому *Rhizobium*, оказалась очень стабильной в клетках *A. brasilense*, а спонтанная транспозиция Tn5 в штаммах ATCC29710 [40] и ATCC29145 [14] не была обнаружена. Однако Эльмерих и Франш [14] коротко описали метод выделения Tn5-содержащих мутантов, который основан на несовместимости между pJB4JI и pJB3JI (IncP, Tc, Cb).

Генетический обмен

До сих пор не удавалось использовать фаги и плазмиды *Azospirillum* для генетического обмена. Мишра и др. [30] сообщили о трансформации с помощью ДНК у штамма *A. brasilense* Sp7, но их метод до сих пор не был использован для установления генетического сцепления.

Плаزمид R68.45 [21] способна мобилизовать хромосому у различных грамотрицательных бактерий, включая *Rhizobium* [26]. Это свойство отмечено и у штамма *A. brasilense* Sp7, кроме того, было выявлено сцепление между несколькими парами маркеров [18].

ГЕНЕТИКА АЗОТФИКСАЦИИ

Гомология между суммарной ДНК *Azospirillum* и генами *nifHDK Klebsiella pneumoniae*

Оперон *nifHDK K. pneumoniae*, кодирующий полипептиды нитрогеназного комплекса, располагается в одном EcoRI-фрагменте 6,2 т. п. н. [9]. При использовании этого фрагмента в качестве пробы была установлена гомология с суммарной ДНК большого числа diaзотрофов [38], включая несколько штаммов *Azospirillum* [14, 36]. Локализация генов на плазмиде показана не была (Дар-

ген, Робсон; *неопубликованные результаты*, полученные в лаборатории автора).

Клонирование *nif*-области из *Azospirillum*

EcoRI-Фрагмент 6,7 т. п. н. штамма *A. brasilense* Sp7, гомологичный пробе *nifHDK* *K. pneumoniae*, был клонирован на векторе — бактериофаге λ [36]. Гетеродуплексный анализ позволил установить, что протяженность участка гомологии между этими двумя ДНК составляет около 5 т. п. н. Это согласуется с наличием у *Azospirillum* полного набора генов *nifHDK* [36].

Белки, кодируемые *EcoRI*-фрагментом 6,7 т. п. н. *Azospirillum*, проанализировали в мини-клетках *E. coli* по методу Рива [37]. Выявлены пять полипептидов, молекулярные массы которых около 54 000, 52 000, 36 000, 31 000 и 27 000 [36]. Некоторые из них могут соответствовать полипептидам — компонентам нитрогеназы.

Генетическая комплементация *nif*-мутантов

Применив клонированный *EcoRI*-фрагмент 6,7 т. п. н., который содержит гены *nifHDK* *nif*-области *Azospirillum*, нам удалось начать генетический анализ генов азотфиксации с помощью комплементации. Были сконструированы и внесены с помощью конъюгации в *Nif*-мутанты штамма *A. brasilense* Sp7 [25] варианты плазмиды pRK290 [12], которая несет *nif*-ДНК *Azospirillum*. Восстановление фиксации азота наблюдалось в случае мутанта 7571, у которого, вероятно, поврежден структурный ген нитрогеназного комплекса [25]. Это первый генетически охарактеризованный *nif*-мутант *Azospirillum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии, относящиеся к роду *Azospirillum*, практически неизвестные или забытые 10 лет назад, ныне представляются диязотрофами, которые доступны для генетического анализа и которые могут быть использованы в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве.

Хотя генетика *Azospirillum* лишь начинает разрабатываться, уже возможно применение таких фундаментальных методов, как химический или биологический мутагенез, мобилизация хромосомы и создание диплоидов. Первые результаты обнадеживают, и уже применяемая методология логически должна привести к построению хромосомной карты сцепления и к лучшему пониманию организации *nif*-генов.

Благодарности. Автор хотел бы поблагодарить докторов Даггана, Клипгмюллера, Хартмана и Робсона за сообщение неопубликованных результатов. Работа в лаборатории автора финансировалась фондами Эльф-Аквитен и Министерством горных и химических предприятий.

1. Bani D, Barberio C, Bazzicalupo M, Favelli F, Gallori M (1980) Isolation and characterization of glutamate synthase mutants of *Azospirillum brasilense*. *J Gen Microbiol* 119:239—244
2. Barberio C, Bazzicalupo M, Gallori E, Polsinelli M (1982) Regulation of ammonium assimilation and N₂ fixation in *Azospirillum brasilense*. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 52
3. Becking JH (1982) *Azospirillum lipoferum* — a reappraisal. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 130
4. Berg DE (1977) Isolation and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5. In: Bukhari AI, Shapiro JA, Adhya SL (eds) DNA insertion elements, plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, p 205
5. Beringer J, Beynon JL, Buchanan-Vollaston AV, Johnston AWB (1978) Transfer of the drugresistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* 275:633—634
6. Berkum P van, Bohlool BB (1980) Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol Rev* 44:491—517
7. Bülow JFM von, Döbereiner J (1975) Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2389—2393
8. Bukhari AI (1977) Bacteriophage Mu as a transposon element. *Annu Rev Genet* 10:389—412
9. Cannon FC, Riedel GE, Ausubel FM (1980) Overlapping sequences of *K. pneumoniae* *nif*DNA cloned and characterized. *Mol Gen Genet* 174:59—66
10. Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Dénarié J (1979) Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J Gen Microbiol* 113:229—242
11. Datta N, Hedges RW (1971) Compatibility groups among fi⁻ R factors. *Nature* 234:222
12. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helsinki D (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7347—7351
13. Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria. *Plasmid* 1:584—588
14. Elmerich C, Franche C (1982). *Azospirillum* genetics: plasmids, bacteriophages and chromosome mobilization. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 9
15. Elmerich C, Quiviger B, Rosenberg C, Franche C, Laurent P, Döbereiner J (1982) Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum*. *Virology* 122:29—37
16. Franche C (1981) Thesis. University Paris 7, France
17. Franche C, Elmerich C (1981) Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 132A:3—17
18. Franche C, Canélo E, Gauthier D, Elmerich C (1981) Mobilization of the chromosome of *Azospirillum brasilense* by plasmid R68-45. *FEMS Microbiol Lett* 10:199—202
19. Franco-Lemos MV, Maringolo VL (1980) Abstr 4th Symp Nitrogen Fixation. Canberra, Australia
20. Gauthier D, Elmerich C (1977) Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett* 2:101—104
21. Haas D, Holloway BW (1978) Chromosome mobilization by the plasmid R68—45: a tool in *Pseudomonas genetics*. *Mol Gen Genet* 158:229—237
22. Hartmann A (1982) Antimetabolite effects on nitrogen metabolism of *Azospirillum* and properties of resistant mutants. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 59
23. Hartmann A, Singh M, Klingmüller W (1983) Isolation and characterization

- of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. Can J Microbiol (in press)
24. Heulin T, Bally R, Baiandreau J (1982) Isolation of a very efficient N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 92
 25. Jara P, Quiviger B, Laurent P, Elmerich C (1983) Isolation and genetic analysis of *Azospirillum brasilense* Nif⁻ mutants. Can J Microbiol (in press)
 26. Kondorosi A, Vincze E, Johnston AWB, Beringer JE (1980) A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. Mol Gen Genet 178:403—408
 27. Magalhaes LMS, Neyra CA, Döbereiner J (1978) Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N₂-fixing *Azospirillum* spp. Arch Microbiol 117:247—252
 28. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoresis method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J Bacteriol 127:1529—1537
 29. Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
 30. Mishra AK, Roy P, Bhattacharya-S (1979) Deoxyribonucleic acid-mediated transformation of *Spirillum lipoferum*. J Bacteriol 137:1425—1427
 31. Nelson L, Knowles R (1978) Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. Can J Microbiol 24:1395—1403
 32. Neyra CA, Döbereiner J, Lalande R, Knowles R (1977) Denitrification by nitrogen-fixing *Spirillum lipoferum*. Can J Microbiol 23:300—305
 33. Okon Y, Albrecht SL, Burris RH (1976) Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J Bacteriol 127:1248—1254
 34. Okon Y, Houchins JP, Albrecht SL, Burris RH (1977) Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell free extracts. J Gen Microbiol 98:87—93
 35. Polsinelli M, Baldanzi E, Bazzicalupo M, Gallori E (1980) Transfer of plasmid pRD1 from *Escherichia coli* to *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet 178:709—711
 36. Quiviger B, Franche C, Lutfalla G, Rice D, Haselkorn R, Elmerich C (1982) Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. Biochimie 64:495—502
 37. Reeve JN (1977) Bacteriophage infection of minicells. Mol Gen Genet 158:73—79
 38. Ruvkun GB, Ausubel FM (1980) Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc Natl Acad Sci USA 77:191—195
 39. Sampaio M-JAM, Silva EMR da, Döbereiner J, Yates MG, Pedrosa FO (1981) Autotrophy and methylotrophy in *Derris gummosa*, *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. In: Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation. Aust Acad Sci, Canberra City, p 444
 40. Singh M (1982) Transfer of bacteriophage Mu and transposon Tn5 into *Azospirillum*. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 35
 41. Singh M, Wenzel W (1982) Detection and characterization of plasmids in *Azospirillum*. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 44
 42. Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can J Microbiol 24:967—980
 43. Wood AG, Menezes EM, Dykstra C, Duggan DE (1982) Methods to demonstrate the megaplasmids (or minichromosome) in *Azospirillum*. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* genetics, physiology, ecology. Birkhäuser, Basel, EXS42, p 18

43. ГЕНОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ У RHIZOBIACEAE

У. ХОЙМАН, Б. МЕРКТ, А. РЕШ, Р. ШПРИНГЕР, Б. РЮГЕР,
Д. ХОРН, И. БАУЭР, К. ВИНКЛЕР и Э. ВАГНЕР*

ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследований по молекулярной генетике, полученные в последние годы, показали, что природа создала такие структурные особенности ДНК, которые способны строго контролировать перестройки генетического материала, важные для эволюции, развития и дифференцировки (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1980). Мы наблюдали у Rhizobiaceae в стрессовых условиях полную перестройку порядка расположения генов. Из клеток дикого типа могут образоваться пять разных классов бактерий с явно новым сочетанием признаков и маркеров. Такие геномные перестройки характерны для всех видов *Rhizobium* и *Agrobacterium*. Указанные пять классов новых бактерий, появляющихся в процессе перестроек, с одной стороны, различаются по многим биологическим и генетическим класс-специфичным признакам, а с другой стороны, проявляют объединяющие их признаки, свидетельствующие об их родстве с Rhizobiaceae. Перестройки в этой системе из пяти классов обратимы.

СТРЕССОВЫЕ УСЛОВИЯ

Первоначально мы наблюдали появление новых штаммов в культурах *Rhizobium* под влиянием различных обработок, например после химического мутагенеза, после возобновления роста культур, взятых со старых агаризованных сред, и после теплового воздействия. Мы стали исследовать это явление более тщательно после неоднократного появления в наших культурах диазотрофных штаммов с очень характерными особенностями, которые растут за счет N_2 в качестве единственного источника азота в обычной атмосфере. Это наблюдение, сделанное около 10 лет назад, представлялось достаточно важным, чтобы приступить к программе фундаментальных исследований, касающихся изменчивости ризобияльного генома. Тем временем мы анализировали реакцию штаммов дикого типа многих *Rhizobium* и *Agrobacterium* на разнообразные условия культивирования, чтобы найти надежный способ индукции геномных перестроек. Мы установили, что в общем

* W. Heumann, B. Merkt, A. Rösch, R. Springer, B. Rüger, D. Horn, I. Bauer, K. Winkler, and E. Wagner, Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Erlagen-Nürnberg, 8520, Erlangen, BRD.

43.1. Жидкие стрессовые среды, использованные для индукции геномных перестроек, и диагностические чашки для выявления характерных новых штаммов

Стрессовое воздействие	Источник	
	углевода	азота
1. Жидкая минимальная среда	—	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2. Жидкая минимальная среда	Глюкоза	KNO_3
3. Жидкая минимальная среда	—	KNO_3
4. Жидкая минимальная среда	Декстрин	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
5. Жидкая минимальная среда	Декстрин	KNO_3
Диагностические чашки		
1. Питательный агар Lab-letco		
2. Агар с дрожжевым экстрактом и маннитом		
3. Агар с минимальной средой		
4. Агар <i>Azotobacter</i> , не содержащий источника азота		

случае любые стрессовые воздействия, применяемые к растущим клеткам, более или менее надежно индуцируют подобное клеточное состояние перестроек генома. Обычно мы выращиваем культуры в логарифмической фазе роста на оптимальной среде, за исключением того, что источники углеводов или азота в ней либо отсутствуют, либо заменены на плохо метаболизируемые соединения, например глюкоза на декстрин или сульфат аммония на нитрат (табл. 43.1).

Жидкие стрессовые среды инокулировали клетками каждого штамма в нескольких параллельных повторностях и продолжительное время инкубировали их на пробирочном роллере. Время от времени образцы этих культур высевали на четыре разные диагностические среды (табл. 43.1), на которых наиболее отчетливо выявляются ростовые характеристики пяти возможных новых классов бактерий. Время появления штаммов с новыми перестройками предсказать невозможно; иногда они появляются через несколько дней после начала стрессового воздействия, а иногда проходит несколько недель, прежде чем удастся обнаружить новые типы бактерий. Но в результате стрессового воздействия на штамм дикого типа неизбежно появляются один или даже несколько новых бактериальных типов, характеристики которых всегда соответствуют одному или нескольким из указанных классов. Отчетливые различия между этими пятью классами перестроенных ризобий по многим биологическим, биохимическим и молекулярным характеристикам, регулярность их появления и обратимость процесса перестройки путем дальнейшего стрессового воздействия представляются серьезными аргументами в пользу происхождения и подлинности таких штаммов.

ПЯТЬ КЛАССОВ ПЕРЕСТРОЕННЫХ КЛЕТОК RHIZOBIACEAE

В таблице 43.2 показаны представители пяти перестроенных классов бактерий, которые образовались в результате стрессовых воздействий из штаммов *Rhizobium* и *Agrobacterium* дикого типа. Когда начинается процесс перестройки геномов дикого типа, он всегда приводит к превращениям геномов, характерных для одного или нескольких из этих пяти классов. Причем невозможно предсказать, какой из этих классов появится первым; не существует также корреляции между специфичностью стрессового воздействия и числом возникающих перестроенных классов бактерий. Каждый класс, по-видимому, появляется с равной вероятностью, за исключением класса III *nif*-типа, который образуется реже, чем другие классы. Мы накопили большое количество данных об этих пяти бактериальных классах, преследуя три разные цели: во-пер-

43.2. Дикие типы и классы перестроенных геномов Rhizobiaceae

Класс		
I	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;"> Минимальный тип 1,7170 (1,7170) </div>	← { Дикий тип <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
II	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;"> Продикий тип 1,7190 </div>	← { Дикий тип <i>Rhizobium</i> sp.
III	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;"> <i>nif</i>-Тип 1,7235 (1,7170) </div>	Фиксирующий азот асимбиотически аэробно
IV	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;"> Каротиноидный тип, желтый 1,7245 (пл.) </div>	Окрашенный каротиноидами в желтый цвет
V	<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; text-align: center;"> Каротиноидный тип, красный 1,7310 (пл.) </div>	Окрашенный каротиноидами в красный цвет

вых, установить класс-специфичные критерии; во-вторых, показать взаимосвязь этих пяти классов друг с другом и с диким типом путем анализа объединяющих критериев и, наконец, в-третьих, отыскать подход к пониманию механизма такого фундаментального генетического процесса.

Специфичные для класса критерии

Класс I. Минимальный тип. Бактерии класса I в целом очень сходны с диким типом *A. tumefaciens*. Они могут быть охарактеризованы как агробактерии, выведенные от Ti-плазмиды [1]. Бактерии класса I представляют собой быстрорастущие палочковидные клетки, время генерации которых менее 1 ч, их колонии могут быть шероховатыми или гладкими. Клетки весьма подвижны и снабжены фимбриями. Плавающая плотность хромосомной и плазмидной ДНК $\rho = 1,7170 \text{ г/см}^3$. Клетки наследуют две плазмиды: крупную с молекулярной массой 300—320 МДа и размером 20 МДа. Рестрикционный профиль ДНК для *XhoI* и других рестриктаз класс-специфичен и очень похож на рестрикционный профиль ДНК *A. tumefaciens* [4]. Штаммы минимального типа чувствительны к фагам *A. tumefaciens*, но не наоборот [1].

Класс II. Продикий тип. Этот класс в действительности охватывает две незначительно различающиеся группы штаммов: одна группа, ведущая свое происхождение от *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* и *R. trifolii*, эффективно индуцирует клубеньки на сое и потому идентична *R. japonicum*, тогда как другая группа, происходящая от *A. tumefaciens*, *R. japonicum* *R. lupini* утратила способность к индукции опухолей и клубеньков. Представители обеих групп продикого типа растут очень медленно, наилучшая среда для них УМВ, их колонии похожи на колонии медленно растущих штаммов дикого типа. Плавающая плотность хромосомной ДНК $\rho = 1,7720 \text{ г/см}^3$; существование плазмид у них показать не удалось. Их *XhoI*-рестрикционный профиль характерен, но различается у каждой из двух описанных групп штаммов класса II. Особенно примечательным представляется постепенное снижение специфичности по отношению к хозяину в этой группе от быстрорастущих штаммов дикого типа *R. japonicum* до штаммов, неспособных формировать клубеньки при одновременной утрате плазмидной ДНК. Мы тестировали не образующие клубеньки штаммы продикого типа по способности восстанавливать специфичность дикого типа путем инфекции соответствующих хозяев. В этих опытах по образованию клубеньков в двух случаях мы получили штаммы *R. meliloti* и *R. trifolii*. После повторного выделения у данных штаммов обнаружались новые характеристики ДНК (рестрикционный профиль и плазмиды). Предстоит большая работа по выяснению роли растения-хозяина в ходе инфекции не образующими клубеньки штаммами продикого типа.

Класс III. *Nif*-Тип. Это очень быстро растущие бактерии с временем генерации менее 1 ч, очень изменчивым материалом

клеточной оболочки, а следовательно, и варьирующей формой колоний. Клетки очень подвижны и поэтому образуют нарастающую кайму вокруг каждой колонии на агаризованных средах. Наиболее примечательной чертой клеток класса III является асимбиотическая фиксация азота в аэробных условиях. Такая активность этих штаммов указывает на наличие полностью дерепрессированной нитрогеназы на агаризованных средах, лишенных азота. Фермент восстанавливает ацетилен до 15—20 нмоль этилена/(мг белка · мин); его активность сохраняется в течение более 8 нед. Плавающая плотность хромосомной ДНК $\rho = 1,7235$ г/см³. Все штаммы *nif*-типа несут две большие плазмиды с молекулярной массой 130 МДа и 220 МДа, иногда присутствуют меньшие плазмиды с молекулярной массой 5 МДа и 14 МДа. Плавающая плотность плазмидной ДНК $\rho = 1,7170$ г/см³. Рестрикционные профили всех ДНК класса III, полученные при использовании *Xho*I и других рестриктаз, идентичны и класс-специфичны. Гибридизация плазмидной ДНК *nif*-типа с клонированной пробной ДНК структурных *nif*-генов *Klebsiella* или *R. meliloti* предварительно указала на локализацию структурных *nif*-генов на плазмиде с молекулярной массой 220 МДа. Из штаммов *nif*-типа *A. tumefaciens* дальнейшим стрессовым воздействием можно получать штаммы дикого типа и каротиноидного типа классов IV и V; однако нам не удавалось обнаружить ризобияльные штаммы дикого типа.

Класс IV. Каротиноидный тип, желтый. Главной особенностью этих штаммов является их ярко-желтая каротиноидная пигментация. Биохимические свойства и структуру этих каротиноидов анализировали Кляйниг и др. [8]; они оказались производными β , β -каротина. Подробно изучались и другие особенности этих штаммов, в частности их высокоэффективная конъюгационная система (см. обзор [3]). Для этих бактерий в основном характерна палочковидная форма, однако в одной из подгруппы класса IV клетки имеют форму бактериоидов, очень похожих на клубеньковые бактериоиды [4]. Плавающая плотность ДНК бактерий класса IV палочковидной и бактериоидной формы $\rho = 1,7245$ г/см³. Желтые штаммы каротиноидного типа обычно не наследуют плазмид; они характеризуются класс-специфичным рестрикционным профилем под действием *Xho*I и других рестрикционных эндонуклеаз.

Класс V. Каротиноидный тип, красный. Штаммы данного класса окрашены каротиноидами в красный цвет. Структура этого пигмента также изучалась Кляйнигом и др. [9]. Он представляет собой глюкозильный эфир С30-каротиновой кислоты. Этот пигмент уникален и отличен от каротиноида штаммов класса IV. Следовательно, можно предполагать, что биосинтетические пути этих двух каротиноидов контролируются разными участками ДНК. Мутагенезом соответствующих бактериальных штаммов не удается превратить один пигмент в другой. Клетки бактерий класса V имеют очень характерную форму — они крупные, подвижные, снабжены ворсинками. Период их генерации превышает 4 ч. Пла-

вучая плотность ДНК находится между 1,7290 и 1,7310 г/см³. Некоторые из этих штаммов наследуют 2—5 плазмид с молекулярной массой 12—350 МДа. Некоторые штаммы не содержат внехромосомной ДНК. *Xho*I-Рестрикционный профиль класс-специфичен. Конъюгационная фертильность между разными мутантами класса V весьма низкая.

Взаимосвязь между бактериями пяти классов и диких типов по объединяющим критериям

Мы выделили из почвы бактериофаги, специфичные для каждого класса. Тесты на фаготипы, проведенные с этим материалом, показали, что все бактериальные штаммы одного класса поддерживают размножение класс-специфичных фагов с одинаковой эффективностью. Однако в опытах по перекрестному заражению бактериальных штаммов других классов также выявлен рост фагов, хотя и сильно ограниченный. Рост фагов, модифицированных подобным образом, на исходном хозяине был ограниченным. Результаты этих опытов показывают, что каждый бактериальный класс характеризуется своей собственной системой рестрикции и модификации и что штаммы всех классов способны поддерживать рост фагов из бактерий всех других классов. Контрольные эксперименты по размножению этих фагов на *E. coli* C или на других таксономически неродственных бактериях были безрезультатными. Продолжая опыты по изучению системы рестрикции и модификации каждого класса, мы выделили и очистили рестриктазы из бактерий классов II и IV и показали, что ДНК их собственного штамма не расщепляется в отличие от ДНК штаммов всех других классов.

Рестриктазы остальных классов пока не очищены; результаты опытов с неочищенными препаратами также подтвердили класс-специфичность разных систем рестрикции и модификации.

О взаимосвязи штаммов указанных пяти классов свидетельствует перекрестная конъюгационная фертильность: мутанты класса IV скрещиваются с мутантами классов V, III и II. Поскольку конъюгационный перенос у ризобий регулируется таксон-специфичной системой хромосомной фертильности [6], такие скрещивания подтверждают взаимосвязь соответствующих штаммов. При описании пяти классов (см. введение) было показано генетическое и молекулярное сходство штаммов продикого типа ризобий и штаммов минимального типа с диким типом агробактерий. Это является еще одним аргументом в пользу наличия связи между «классическим» родом *Rhizobiaceae* и их производными с перестроенным геномом. Особый интерес представляет тот факт, что из всех штаммов ризобий дикого типа с помощью стрессовых воздействий можно получить штаммы агробактерий дикого типа. Такое превращение необратимо.

Подход к пониманию механизма геномных перестроек

В таблице 43.2 представлены пять перестроенных классов в порядке увеличения плавучей плотности ДНК, начиная с класса I ($\rho=1,7170$ г/см³) и кончая классом V ($\rho=1,7310$ г/см³). Подобное изменение плотности можно объяснить тем, что штаммы всех классов содержат различные доли легкой и тяжелой ДНК и при сдвиге одна часть ступенчато амплифицируется, а другая уменьшается, и наоборот — при обратном сдвиге. Плазмидная ДНК, очевидно, не подвержена этому процессу, так как внехромосомная ДНК классов I и III, а также двух классов дикого типа всех штаммов всегда обладает самой низкой плотностью среди Rhizobiaceae ($\rho=1,7170$ г/см³).

Другой характерной чертой ДНК Rhizobiaceae является высокая частота встречаемости IS-элементов. Охарактеризован IS-элемент ризобиального класса IV, ISR1 [2, 10]. Мы гибридизовали эту ISR1-ДНК с фрагментированной ДНК многих различных штаммов класса IV и установили, что в разные участки бактериальной хромосомы встроено более 20 копий ISR1. Охарактеризован еще один IS-элемент *R. meliloti* (ISRm1) [11], который может транспонироваться в несколько участков генома *R. meliloti*. Эти результаты явно указывают на то, что за динамический характер генома Rhizobiaceae, хотя бы частично, ответственны IS-элементы.

На основании анализа конъюгационной системы бактерий класса IV можно выдвигать дальнейшие предположения о механизме геномных перестроек; мы показали, что после конъюгационного переноса донорная ДНК встраивается в реципиентную хромосому, образуя меродиплоидную зиготу. В потомстве этой зиготы путем внутриврохромосомной рекомбинации возникают многочисленные типы рекомбинантов [5, 12]. Учитывая наличие многих IS-последовательностей, обеспечивающих хромосому гомологичными участками, можно предположить, что в механизм геномных перестроек, обсуждаемых в данной статье, вовлечен процесс внутриврохромосомной рекомбинации.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК

Геномные перестройки у Rhizobiaceae на первый взгляд кажутся несовместимыми с понятием видовой специфичности, однако они расширяют определение вида. Как было показано, из одного бактериального вида путем геномных перестроек могут образоваться несколько разных видов, причем этот процесс обратим. Все эти виды имеют одну и ту же таксономическую категорию, поскольку они происходят от одного и того же генома. Механизм и степень подобной геномной изменчивости строго регулируются. Поэтому они свидетельствуют о расширении понятия вида, а не устранении его. Каждый класс бактерий, который рассматривался как ведущий свое происхождение от Rhizobiaceae, совершенно стабилен при оптимальных для соответствующего класса услови-

ях роста. Для его превращения в другие классы необходимы силь-
нодействующие стрессовые условия. С точки зрения эволюцион-
ного выживания и улучшения геномные перестройки дают соот-
ветствующему бактериальному таксону мощное средство для ге-
нетического взаимодействия с растениями, что приводит к форми-
рованию симбиотических клубеньков и патогенных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauer I (1981) Genomumstrukturierung bei *Rhizobiaceae*. Dipl Diss, Univ Erlangen
2. Burkardt HJ et al (1979) Naturally occurring insertion mutants of broad host range plasmids RP4 and R68. In: Timmis KN, Pühler A (eds) Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, p 494
3. Heumann W (1979) *Rhizobium lupini* genetics. Curr Top Microbiol Immunol 88:1—23
4. Heumann W (1981) *Rhizobium* genetics. In: Bothe H, Trebst A (eds) Biology of inorganic nitrogen and sulfur. p 384
5. Heumann W, Springer R (1977) Formation of merodiploid clones by conjugation in *Rhizobium lupini*. Mol Gen Genet 150:73—79
6. Heumann W et al (1971) The two transfer regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. Fertility factor elimination and one way transfer. Mol Gen Genet 113:308—315
7. Heumann W et al. (1973) The two transfer regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. Genetic characterizations of the transferred chromosomal segments. Mol Gen Genet 126:267—274
8. Kleinig H et al (1977) Carotenoids of *Rhizobia*. I. New carotenoids from *Rhizobium lupini*. Helv Chim Acta 60:254—258
9. Kleinig H et al (1979) New C₃₀-carotenoic acid glucosyl esters from *Pseudomonas rhodos*. Z Naturforsch 34c:181—185
10. Priefer UB et al (1981) *IsRI*: An insertion element isolated from the soil bacterium *Rhizobium lupini*. Movable genetic elements. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 45:1025
11. Ruvkun GB et al (1981) Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 45:494—499
12. Springer R, Heumann W (1978) Genetical analysis of merodiploidy in *Rhizobium lupini*. Mol Gen Genet 165:57—63

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие к английскому изданию	8
ОБЩЕЕ ВВЕДЕНИЕ	9
1. Исторический обзор изучения взаимодействия бактерий с растениями. У. Хойман	10
2. Взаимодействие <i>Rhizobium</i> с растениями. Дж. Беринджер	16
3. Тропа опинов. Ж. Тампе и А. Пти	21
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ RHIZOBIUM С РАСТЕНИЯМИ	43
I. Система <i>Rhizobium meliloti</i> — <i>Medicago sativa</i>	
4. Изучение плазмид <i>Rhizobium meliloti</i> и их участия в контроле образования клубеньков и азотфиксации: мегаплазмиды pSym и другие крупные плазмиды. Т. Юге, К. Розенберг, Ф. Касс-Дельбар, П. де Лажюди, Л. Жуанен, Ж. Батю, П. Буастар, Ж.-С. Жюллио и Ж. Денарье	44
5. Изучение плазмид <i>Rhizobium meliloti</i> и их участия в контроле образования клубеньков и фиксации азота. Мутагенез мегаплазмиды pSym с помощью область-специфичного транспозона. И. Душа, М. Реналье, Б. Терзаги, А. Гарнерон, П. Буастар и Ж.-С. Жюллио	56
6. Анализ генов симбиотической фиксации азота, содержащихся в мегаплазмиде <i>Rhizobium meliloti</i> . А. Кондороши, Э. Кондороши, З. Банфальви, У. Браунтон, К. Пэнкхерст, Г. Рандхава, К.-Х. Вонг и Дж. Шелл	65
7. Характеристика генетических локусов <i>Rhizobium meliloti</i> , участвующих в симбиотической фиксации азота. В. Шето, Я. Циммерман и Ф. Аусюбель	74
8. Картирование и регуляция структурных генов <i>niJK</i> , <i>niJD</i> и <i>niJH</i> <i>Rhizobium meliloti</i> . А. Пюлер, В. Клипп и Г. Вебер	80
9. Гены, контролирующие ранние стадии образования клубеньков у <i>Rhizobium meliloti</i> . С. Лонг, Т. Джекобс, Д. Биб и Т. Эгельхоф	90
10. Гены симбиотической фиксации азота у <i>Rhizobium meliloti</i> . Г. Дитта, Д. Корбин, С. Леонг, Л. Барран и Д. Хелински	101
11. Векторные плазмиды для манипуляций с граматрицательными бактериями <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> . Р. Симон, У. Прифер и А. Пюлер	113
II. Система <i>Rhizobium leguminosarum</i> — <i>Pisum sativum</i>	
12. Генетический анализ pRL1J1 — симбиотической плазмиды <i>Rhizobium leguminosarum</i> . Дж. Дауни, Г. Хомбрехер, К.-С. Ма, С. Найт и А. Джонстон	123
13. Естественная изменчивость среди плазмид рода <i>Rhizobium</i> . Н. Бруин, Н. Дибб и Г. Хомбрехер	129
14. Анализ специфичных для клубеньков растительных и бактериоидных белков растений гороха, инокулированных бактериями <i>Rhizobium leguminosarum</i> , мутагенизированными транспозоном. Г. Ван-ден-Бос, Т. Шетгенс, Т. Бисселинг, И. Хонтелез и А. Ван Каммен	138

III. Система *Rhizobium japonicum* — *Glycine max*

15. Свободноживущие ризобии связывают N_2 для поддержания своего роста с помощью механизма перекрестного питания. *Р. Людвиг* 148
16. Гены нитрогеназы у *Rhizobium japonicum*. *Хеннеке, М. Фурман, М. Хан, К. Калуца, Б. Регенсбургер и Р. Вирт* 161
17. Структура и организация генов леггемоглобина у сои. *К. Маркер, К. Бойсен, Э. Енсен, К. Палудан и О. Виборг* 169
18. Роль генов растения во взаимоотношениях сои с *Rhizobium*. *Д. Верма, Х. Бергман, Ф. Фуллер и Э. Предди* 176

IV. Взаимодействие различных видов *Rhizobium* с растениями

19. Общая характеристика генов, ответственных за фиксацию азота у *Rhizobium phaseoli*. *Р. Паласиос, К. Кинто, Х. Де-ла-Вега, М. Флорес, Л. Фернандес, М. Эрнандес, Т. Бальядо и Г. Соберон-Чавес* 185
20. Идентификация генов, ответственных за фиксацию азота и образование клубеньков, на крупной плазмиде из штамма *Rhizobium* sp. с широким спектром хозяев. *К. Пэнкхерст, У. Браунтон, К. Бахем, Э. Кондорози и А. Кондорози* 190
21. Идентификация, мобилизация в широкий круг хозяев и мутагенез контегративной плазмиды *Rhizobium trifolii* Sym::R68.45. *К. Ронсон и Д. Скотт* 199
22. Генетический анализ областей локализации генов симбиоза у *Rhizobium trifolii* и *Rhizobium parasponia*. *Б. Рольф, М. Джорджевич, Н. Моррисон, Дж. Плазински, Г. Бендер, Р. Ридж, У. Зурковски, Дж. Теллам, П. Грессхоф и Дж. Шайн* 211
23. Молекулярная анатомия симбиотической области ДНК у *Rhizobium trifolii* и *Rhizobium parasponia*. *Дж. Шайн, К. Скотт, Ф. Феллоуз, М. Джорджевич, П. Шофилд, Дж. Уотсон и Б. Рольф* 228
24. Образование клубеньков на стебле *Aeschynomene*: модельная система взаимоотношений бактерий с растениями. *Р. Легоцки, А. Игльем и А. Салаи* 235

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В СИСТЕМЕ AGROBACTERIUM — РАСТЕНИЕ 247

I. Индуцирующие опухоли плазмиды *Agrobacterium*

25. *onc*- и *vir*-Гены, локализованные на Ti-плазмиде *Agrobacterium tumefaciens*. *И. Хилле, Й. Ван Кан и Р. Схильперорт* 248
26. Плазмидные гены, существенные для взаимодействия агробактерий и ризобий с растительными клетками. *П. Хойкаас* 254
27. Генетический анализ специфичности круга хозяев у *Agrobacterium*. *В. Кнауф, М. Янофски, М. Гордон и Э. Нестер* 264
28. Биология генетической трансформации высших растений с помощью *Agrobacterium rhizogenes*. *Д. Тенфер* 272
29. Выражение T-области октопиновой плазмиды pTiAch5 в бактериальных системах с образованием белков. *И. Шредер, В. Клипп, А. Хиллебранд, Р. Эринг, К. Конч и Г. Шредер* 283

II. Роль T-ДНК в трансформированных клетках растений

30. Липосомы в качестве переносчиков Ti-плазмид в протопласты. *Т. Нагата* 293
31. Трансформация растительных протопластов клетками *Agrobacterium tumefaciens* и ДНК ее Ti-плазмиды. *Г. Вуллемс, Ф. Кренс и Р. Схильперорт* 300
32. Изучение интеграции опухолеродной ДНК нопалиновой Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, *П. Замбриский* 312
33. Транскрипция Ti-плазмиды в корончато-галловых опухолях. *С. Гелвин, С. Карчер, В. Ди Рита и Э. Талиерсио* 320
34. TR-Гены, участвующие в синтезе агропина. *И. Вельтен, Л. Вильмитцер, Й. Лееманс, Й. Эллис, Р. Деблер, М. Ван Монтегю и Дж. Шелл* 332

35. Транскрипция Т-ДНК в корончатых галлах октопинового и нопалинового типа. Л. Вильмитцер, П. Дэзе, П. Шрайер, М. Ван Монтегю и Дж. Шелл	344
36. Генетический анализ Т-ДНК и регенерация трансформированных растений. Дж. Лееманс, Дж. Хернальстенс, Р. Деблер, Х. Де Грее, Л. Тиа-Тунг, М. Ван Монтегю и Дж. Шелл	353
ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И СМЕЖНЫЕ ВОПРОСЫ	
37. Генетика патогена вишни <i>Pseudomonas syringae</i> pathovar <i>morsprunogit</i> . А. Вивиан, Дж. Эррингтон и Д. Вил	364
38. Подход к генетическому анализу патогенности <i>Xanthomonas campestris</i> . М. Даниелс, П. Тэрнер, К. Барбер, У. Клири и Г. Рид	371
39. Молекулярный анализ генов вирулентности у <i>Pseudomonas solanacearum</i> . Б. Стаскавич, Д. Дальбек, Дж. Миллер и Д. Дамм	377
40. Клонирование генов, вовлеченных в образование центров кристаллизации льда под влиянием бактерий и в синтез флуоресцирующего пигмента (сидерофора). К. Орсер, Б. Стаскавич, Дж. Лопер, Н. Папоцелос, Д. Дальбек, С. Линдоу и М. Шрот	385
41. Генетика вирулентности и синтеза индолилуксусной кислоты <i>Pseudomonas savastanoi</i> . Л. Комаи и Т. Косуге	395
42. Генетика <i>Azospirillum</i> . К. Эльмерих	400
43. Геномные перестройки у <i>Rhizobiaceae</i> . У. Хойман, Б. Меркт, А. Реш, Р. Шпрингер, Б. Рюгер, Д. Хорн, И. Бауэр, К. Винклер и Э. Вагнер	406

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИИ С РАСТЕНИЯМИ

Зав. редакцией В. Е. Машковский

Редактор И. А. Фролова

Мл. редактор Л. Н. Погудкина

Художественный редактор В. А. Чуракова

Художник В. П. Трифонов

Технические редакторы В. А. Боброва, Т. Б. Платонова

Корректор А. П. Шахрова

ИБ № 4858

Сдано в набор 22.05.87. Подписано к печати 21.09.87. Формат 60×90^{1/16}. Бумага офсетная. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 26. Усл. кр.-отт. 26. Уч.-изд. л. 29,39. Изд. № 578. Тираж 1930 экз. Заказ № 412. Цена 6 р. 20 к.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП, Москва, Б-53, ул. Садовая-Спаская, 18.

Московская типография № 6 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.

109088, Москва, Ж-88, Южнопортовая ул., 24.