

1. Luský M., Botchan M. Inhibition of SV40 replication in simian cells by pBR322 DNA sequences // Nature.— 1981.— 293.— P. 79—81.
2. Сасина Л. К., Ландау С. М., Кордюм В. А. Конструирование и анализ двурепликонных гибридных плазмид, содержащих геном обезьяньего паповавируса SV40 // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1986.— № 1.— С. 26—30.
3. Suissa M. Spectrophotometric quantitation of silver grains eluted from autoradiograms // Anal. Biochem.— 1983.— N 133.— P. 511—514.
4. Исследование репликации плазмид, содержащих геном SV40, в клетках млекопитающих / С. М. Ландау, Л. К. Сасина, Н. А. Чашин, Л. И. Чашина // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 3.— С. 134—136.
5. Persistence of freely replicating SV40 recombinant molecules carrying a selectable marker in permissive simian cells / L. C. Tsui, M. L. Breitman, L. Siminovitch, M. Buchwald // Cell.— 1982.— 30, N 3.— P. 499—508.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
 НИИ канцерогенеза Всесоюз. онкол.
 науч. центра АМН СССР, Москва

Получено 26.02.88

УДК 579.262

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ КОЛОНИЗИРУЮТ КСИЛЕМУ КОРНЯ РИСА

Т. Н. Х. Нгуен, Т. Н. Б. Тон, В. А. Тарасенко, Н. А. Козыровская

До недавнего времени внутритканевая локализация азотфиксирующих бактерий, ассоциированных с растением, была строго доказана лишь для представителей рода *Azospirillum* [1, 2]. В ряде публикаций сообщалось о выделении азотфиксирующих бактерий (отличающихся по свойствам от азоспирилл) преимущественно из дикорастущих трав—пионеров в освоении новых ареалов [3—5]. Однако доказательством наличия бактерий во внутренних тканях растения являлась лишь техника выделения бактерий из простерилизованных корней. Недавно группа западно-германских исследователей, применив метод иммунофлюоресценции, впервые показала наличие палочковидных бактерий в аэренхиме корней *Leptochloa fusca* [6]. Нами выделены бактерии с азотфиксирующей активностью из культурного растения — риса — и показана их локализация внутри ткани растения с помощью электронно-микроскопического анализа.

Образцы растений риса были собраны на чеках северного Вьетнама. Корни риса отделяли и стерилизовали 1 %-ным раствором хлорамина *b*. Бактерии изолировали традиционным способом, отбирая фракцию гистоплана для инокуляции на полноценную питательную среду.

Выделенные бактерии VN-1, VN-2, VN-3 представляют собой грамотрицательные палочки, различающиеся по свойствам между собой и несходные с азоспириллами (рисунок, а—в). На полужидком агаре со стартовой дозой азота в микроаэрофильных условиях бактерии VN-3 проявляли азотфиксирующую активность, определяемую по восстановлению бактериями ацетилена до этилена. В газовой фазе флаконов, содержащих клетки этих бактерий, обнаруживали до 1 % этилена по объему через 18 ч после введения во флаконы ацетилена (10 %). Бактерии VN-1 проявляли в условиях дефицита азота очень низкую ацетиленредуктазную активность, вероятно, не связанную с процессом фиксации азота.

В условиях стерильного микровегетационного опыта проведена инокуляция зерновок риса (сорт JR-6A) смесью культур изолированных бактерий (1:1:1). Бактерии VN-2 и VN-3 маркированы признаками устойчивости к рифампицину и налидиксовой кислоте (соответственно); VN-1 (*Rif^r*) отличается способностью образовывать характерный пигмент. Зерновки риса стерилизовали, как описано выше. Контролями служили неинокулированные зерновки и зерновки, инокулированные лабораторным штаммом *E. coli* HB101. После недельной инкубации проростков риса с исследуемыми бактериями на агаре, не содержащем источников углерода и азота [8], ацетиленредуктазная активность ассоциации рис—бактерии составляла 125 ± 11 нмоль C_2H_4 на флакон объемом 30 мл через сутки после введения ацетилена.

Для электронно-микроскопического анализа инфицированных корней риса сегменты корня длиной 4—5 мм фиксировали 2,5 %-ным глютаральдегидом в 0,1 М каоди-

латном буфере, рН 7.2, в течение 3 ч при комнатной температуре, а затем 1 %-ной осмиевой кислотой 1 ч при той же температуре. Образцы обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали эпол-араалдитом. Срезы тканей получали на ультрамикротоме («LKB», Швеция), контрастировали цитратом свинца и изучали на электронном микроскопе JEM-1200 EX. При анализе апексов 7-суточных проростков риса обнаружено скопление бактерий на поверхности корня и между периферическими клетками. В межклеточном пространстве меристемы корня выявлены одиночные клетки



Ультраструктура бактерий, изолированных из корней риса, и клеток корня риса: клетки бактерий VN-1, VN-2 и VN-3 (а, б, в); негативное контрастирование; фрагменты клеток корня риса с бактериями в межклеточном пространстве (д); межклеточное пространство меристемы корня риса, заполненное одиночными бактериями (д); фрагмент метаксилемы 49-суточного корня риса, заполненной бактериями (е)

Ultrastructure of bacteria isolated from rice roots and rice root cells: bacterial rods of strains VN-1, VN-2, VN-3 (a, b, c); fragments of rice root cells containing bacteria within an intercellular space (d); intercellular space of a rice root meristema filled with bacteria (d); a metaxylema fragment of 49 days rice root packed by bacteria (e)

(рисунок, д). Внутри интактных клеток бактерий не обнаружено. На более поздней стадии развития риса (49 сут) одиночные бактерии выявлены в отмирающих клетках с частично разрушенными клеточными стенками. Скопления бактерий обнаружены в отдельных сосудах метаксилемы корня риса (рисунок, е).

Из 49-суточных проростков риса, инокулированных смесью бактерий, на селективных питательных средах с рифампицином или налидиксовой кислотой выделены бактерии, соответствующие по морфологии и культурально-биохимическим признакам изолятам VN-1, VN-2 и VN-3. Из 40 мг сырых корней выделяли 10^3 — 10^6 клеток бактерий в приблизительно равных количествах. Из контрольных проростков бактерии не выделены.

Таким образом, с помощью электронно-микроскопического анализа доказан факт существования азотфиксирующих бактерий (помимо азоспирилл) внутри корня растения и определена их локализация; проведена первичная оценка количества бактерий внутри растительной ткани.

NITROGEN-FIXING BACTERIA COLONIZE RICE ROOT XYLEMA

T. N. H. Nguyen, T. N. B. Ton, V. A. Tarasenko, N. A. Kozyrovskaia

State University, SRV, Hanoi;
Institute of Biology, NRC, SRV, Hanoi;
Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Bacteria possessing low nitrogen-fixing activity have been isolated from the rice histoplane, their localization into rice roots xylema being shown.

1. Patriquin D. C., Doberciner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil // Can. J. Microbiol.—1978.—24, N 6.—P. 734—742.
2. Umali-Garcia M. D., Hubbel D. H., Gaskins M. H. Infection of *Panicum maximum* by *Spirillum lipoferum* // Ecol. Bull.—1978.—26.—P. 373—379.
3. McClung C. R., Patriquin D. C. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter species* from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel // Can. J. Microbiol.—1980.—26, N 8.—P. 881—886.
4. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of *Kallar glass* / B. Reingold, T. Hurek, E.-G. Niemann, J. Fendrik // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—52, N 3.—P. 520—526.
5. Bilal R., Malik K. A. Isolation and identification of N₂-fixing zooglia-forming bacterium from *Kallar glass* histoplane // J. Appl. Bacteriol.—1987.—62, N 2.—P. 289—294.
6. Reingold B., Hurek T., Fendrik J. Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of *Kallar glass* // Appl. Environ. Microbiol.—1987.—53, N 4.—P. 889—891.
7. Garvin S., Linderman W. C. Isolation, characterization, and inoculation of N₂-fixing bacteria from dicotyledonous plants // Can. J. Microbiol.—1986.—32, N 12.—P. 912—916.
8. Neuer G., Kronenberg A., Bothe H. Denitrification and nitrogen fixation by *Azospirillum*. 3. Properties of a wheat-*Azospirillum* association // Arch. Microbiol.—1985.—141, N 4.—P. 364—370.

Ханой. гос. ун-т
Ин-т биологии Нац. центра науч. исследований, Ханой
Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 12.02.88

УДК 577.21

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rplL* Escherichia coli МЕТОДОМ СЛИЯНИЯ С ГЕНОМ *lacZ* В ПЛАЗМИДЕ pNM481

Е. Б. Патон, И. В. Крупская, А. Н. Живолуп

rplL-оперон является частью оперона *rplKAIL-rpoBC* и программирует синтез белков *L10* и *L7/L12*, входящих в большую субъединицу рибосомы [1, 2]. В отличие от всех 52 известных рибосомных белков *E. coli*, синтезирующихся в эквимольных количествах, белок *L7/L12* синтезируется в четырехкратном избытке [1]. По данным S1-картирования [2], основным транскриптом в кластере генов *rplKAIL* является тетрацистронная мРНК, инициируемая промотором P_{L11} . Менее обильны бицистронные транскрипты генов *rplKA* и *rplJL*, инициируемые промоторами P_{L11} и P_{L10} соответственно. Помимо P_{L10} оперон *rplJL* содержит внутренний промотор P_{L12} [3, 4], функция которого *in vivo* не ясна.

Различный уровень экспрессии генов одного и того же оперона может обеспечиваться на уровне транскрипции, трансляции, а также быть следствием различной стабильности мРНК.