

Авторы статьи выражают благодарность Л. А. Чил-Акопян и Н. П. Лебедевой за помощь и содействие в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Африкян Э. К. Успехи микробиологии, 10, 1975.
3. Африкян Э. К., Чил-Акопян Л. А. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 355, 1980.
4. Зурабова Э. Р., Рыжкова А. С., Дубинина Т. П. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 374, 1980.
5. Красильников Н. А., Гикасян А. Б. Микробиология, 33, 4, 664, 1964.
6. Кулагин В. С., Лебедева Н. П., Гиль Т. А., Чумак В. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве 70, 75, Иркутск, 1980.
7. Кулагин В. С. В кн.: Природные условия и ресурсы некоторых районов МНР, Братислава, 218, 1984.
8. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М., 1978.
9. Малокацкова Т. С., Черышева Л. П. В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах. 84, Красноярск, 1980.
10. Ромашева Л. Ф., Балыкин А. В., Видомский Э. В., Шербак В. П. и др. Микробиологические методы борьбы с эктопаразитами птиц. Фрунзе, 1976.
11. Покровская Л. А. Автореф. канд. дисс., Иркутск, 1976.
12. Талалаева Г. Б., Покровская Л. А. В кн.: Микроорганизмы в защите растений от вредных насекомых, 51, Иркутск, 1978.
13. Талалаева Г. Б., Покровская Л. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве, 110, Иркутск, 1979.
14. Талалаева Г. Б. В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах, 134, Красноярск, 1980.
15. Талалаева Г. Б., Малокацкова Т. С., Глуховская Е. В. В кн.: Энтомопатогенные микроорганизмы и их применение в сельском хозяйстве 57, Иркутск, 1982.
16. Чилингарян К. О. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 398, 1980.
17. Barjac H. de, Bonnefoi A. Entomophaga, 7, 1, 5, 1962.
18. Barjac H. de, Bonnefoi A. Invert. Pathol., 11, 3, 335, 1968.
19. Barjac H. de, Bonnefoi A. Entomophaga, 18, 1, 5, 1974.
20. Ohba M., Atsuta K. J. Invert. Pathol., 32, 303, 1978.
21. Krywienszyk I., Dalmage H. T., Hall I. M. et al. J. Invert. Pathol., 47, 1, 62, 1981.
22. Purrini K. Anz. Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltsch., 59, 169, 1977.

ИНИ биологии Иркутского государственного университета
и А. А. Жданова, Институт микробиологии АН
Армянской ССР

Поступило 3.III 1986 г.

УДК 575.24

ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА МУТАГЕНЕЗ И УФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

М. А. ТОПУЗЯН, Э. Г. МУТНЕЦИН, Н. П. БЕГЛАРИН

Показано снижение уровня спонтанных и индуцированных his⁺-his⁻ реверсий у шести штаммов тест-системы Эймса под влиянием фитогормона ГК, а также УФ-чувствительности трех штаммов *Escherichia coli*, несущих мутации по ферментам репарации (*E. coli*, AB1885, ДМ49, РЗ478, дефективные по и гВ, lex A3, polA1). Данная система рекомендуется для выявления антимутагенного эффекта химических соединений.

Յուրյն է տրված ֆիտոհորմոնի ԳԿ ազդեցության տակ էյմսի տեստ-համակարգի զեց շտամների համար his^- — his^+ լուրջում և մակածված ռեբերանների մակարդակի, ինչպես և բաց ռեպարացիայի Ֆերմենտների մոտացրաներ կողմ Escherichia coli երեք շտամների ՌՄ և տողայիների նկատմամբ զգայունության (E. coli AB1885, DM49, P3478, դեֆեկտա-վոր ըստ *uvrB*, *lexA3*, *polA1*) ինչպես Տվյալ համակարգը երաշխավորվում է քիմիական միացությունների հակամուտացիոն էֆեկտի բացահայտման համար:

It has been shown that under the influence of phytohormone GA the level of spontaneous and induced his^- — his^+ reversions of six strains of Alm's test-system, as well as UV-sensitivity in three strains of *Escherichia coli* carrying mutations in reparation ferments (*E. coli* AB1885, DM49, P3478, defective of *uvrB*, *lexA3*, *polA1*) decrease. The given system is recommended for revelation of antimutagenic effect of chemical compounds.

Ключевые слова: микроорганизмы, гибберелловая кислота, мутагенез, УФ-чувствительность.

На большом числе видов высших растений, наряду с физиологической, выявлена также генетическая активность известного фитогормона гибберелловой кислоты (ГК). С ее помощью индуцированы многочисленные полезные мутации, выделены мутантные формы и линии, обеспечивается ускорение плодоношения и повышение урожайности ряда сельскохозяйственных культур как в первый год воздействия на семя, так и в последующих поколениях [1–6]. Предположение о физиологической и генетической активности ГК в организмах подтверждено результатами цитогенетического анализа действия этого фитогормона на семена разного срока хранения, а также электронномикроскопического анализа листьев обработанных растений [7–9].

В настоящей работе представлены результаты изучения молекулярных механизмов генетических эффектов ГК с использованием высокочувствительной микробной системы Эймса [10–12], позволяющей не только выявлять мутагенную активность того или иного соединения, но и судить о первичных молекулярных механизмах их действия, а также различных репарационных мутантов кишечной палочки с идентифицированными мутациями по ферментам репарации.

Материал и методика. Работа выполнена в 1982–1985 гг. на тестерных штаммах *Salmonella typhimurium* системы Эймса [11–13]; характеристики штаммов представлены в табл. 1. Использованы методы полуколичественного и количественного анализов индукции геновых мутаций [10]. Мутагенная активность 0,01–0,1%-ных ГК оценивалась по изменению уровня спонтанных и индуцированных азидом натрия и 2-нитрофлуореном his^- — his^+ реверсий у всех шести штаммов данной системы.

Использованы также репарационные мутанты *E. coli*, любезно предоставленные проф. В. Д. Жестяниковым (Институт цитологии АН СССР). Характеристики штаммов представлены в табл. 3. Выбор данных микробных тест-систем обоснован тем, что в настоящее время отсутствуют маркированные репарационные мутанты растительных систем.

Влияние ГК на УФ-чувствительность разных штаммов *E. coli* изучалось следующим образом. Бактериальные культуры инкубировали при 37°C до $4 \cdot 10^8$ клеток/мл, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. Осадок ресуспендировали в 0,1 М $MgSO_4$ и охлаждали в течение 3–5 мин для предотвращения дальнейшего роста. Бактериальные культуры титровали посевом из соответствующих разведений на полноценные среды. Такую культуру обрабатывали ГК в конечной концентрации

0,02% Контрольные и обработанные ГК культуры облучали двумя дозами УФ-лучей (250 и 750 эрг/мм²). О действии ГК на УФ-чувствительность культур судили по изменению выживаемости бактериальных культур.

Таблица 1. Генотипы индикаторных штаммов *S. typhimurium*

Штаммы	Мутация по гистидину		Дополнительные мутации	
	гис G ₄₄	гис D ₁₀₅₁	LPS	способность к эксцизионной репарации
ТА 1535	+	—	rfa**	uvr B ^{***}
ТА 1538	—	—	rfa	uvr B
ТА 1950	+	—	дикий тип	uvr B
ТА 1534	—	+	дикий тип	uvr B

* — наличие или отсутствие мутации; ** — мутация, приводящая к нарушению комплекса клеточной стенки; *** — мутация, приводящая к нарушению системы эксцизионной репарации. Использованы также штаммы *S. typhimurium* ТА 100 и ТА 98 — производные штаммов ТА 1535 и ТА 1538 с введенной плазмидой рКМ 101.

Таблица 2. Реверсии his[−] → his⁺ в спонтанном и индуцированном мутагенезе *S. typhimurium* с участием ГК

Штаммы	0,1% ГК	0,01% ГК	0,1% ГК — мутаген	0,01% ГК — мутаген
ТА 1534	44,4	61,1	66,3	86,4
ТА 1535	50,0	81,3	62,6	66,4
ТА 1538	55,5	77,7	50,0	53,2
ТА 1950	100	44,4	81,8	84,6
ТА 98	38,8	72,2	82,9	89,5
ТА 100	53,3	100	70,0	74,2

Спонтанный уровень ревертантов 25 кол/чаш при 3·10⁹ кл/мл—100%. Мутаген (5 мкг/чаш) при 1534, 1538, 98—2 НФ, и остальных случаях—азид натрия. Реверсии—%, при выживаемости не ниже 98,8%. Индуцированный уровень ревертантов при 3·10⁹ кл/мл—100%.

Статистическая обработка p<0,001.

Результаты и обсуждение. В табл. 2 представлены результаты исследования индукции генных мутаций у всех шести штаммов *S. typhimurium*—тест-системы Эймса с учетом изменения уровня спонтанных и индуцированных реверсий his[−]→his⁺. Ни у одного штамма ни в одном варианте экспериментов не обнаружено повышения уровня мутаций под влиянием ГК. Более того, выявлено статистически достоверное снижение уровня спонтанных и индуцированных мутаций уже при обработке культур 0,01%-ной ГК, а у отдельных культур—ТА 1534, ТА 98—при 0,1%-ной ГК уровень спонтанных реверсий his[−]→his⁺ снижается до 44,4 и 38,8% соответственно. Штаммспецифичности в этом процессе не обнаружено. Так, максимальное снижение спонтанного уровня реверсий выявлено у плазмидного штамма ТА 98 при обработке бактериальной культуры 0,1%-ной ГК, в то время как на другой плазмидный штамм—ТА 100—эта концентрация почти не оказала влияния.

Таблица 3. Влияние 0,02%-ной ГК на чувствительность различных штаммов *E. coli* к УФ-облучению

Штаммы	УФ-облучение				ГК + УФ облучение			
	10"		30"		10"		30"	
	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %
AB 1157 pur ⁻	$1.6 \cdot 10^8$	50	$1 \cdot 10^8$	25	$2 \cdot 10^8$	50	$1 \cdot 10^8$	25
AB 1686 pur ⁺ A	$1 \cdot 10^8$	25	$8 \cdot 10^7$	20	$1 \cdot 10^8$	25	$6 \cdot 10^7$	15
AB 1855 pur ⁺ B	$3 \cdot 10^8$	0.075	$1.6 \cdot 10^8$	0.0004	$5 \cdot 10^8$	0.125	$4 \cdot 10^8$	0.01
AB 1884 pur ⁺ C	$8 \cdot 10^7$	20	$2 \cdot 10^7$	5	$7 \cdot 10^7$	17.5	$8 \cdot 10^6$	2
JS 2926 rec ⁺ AB	$2 \cdot 10^8$	50	$4 \cdot 10^7$	10	$2 \cdot 10^8$	50	$4 \cdot 10^7$	10
DM 41 lex ⁺ A3	$6 \cdot 10^8$	0.15	$1 \cdot 10^8$	0.0025	$1 \cdot 10^8$	0.25	$1.5 \cdot 10^8$	0.0375
W 3110 pol ⁺	$4 \cdot 10^8$	95	$1.5 \cdot 10^8$	37.5	$2 \cdot 10^8$	50	$8 \cdot 10^7$	20
P 3478 pol ⁺ AI	$8 \cdot 10^7$	20	$1.5 \cdot 10^8$	0.0375	$1 \cdot 10^8$	25	$1.4 \cdot 10^8$	0.35

thr pro leu his thi arg

leu met his thi thy thr

Культура п титре $4 \cdot 10^8$ кл/мл обрабатывалась лампой ОКН-11 на расстоянии
65 см 10"—250 эрг/мм²; 30"—750 эрг/мм².

Статистическая обработка $p < 0.001$.

Таким образом, использование системы штаммов *S. typhimurium* выявило антимагнитный эффект фитогормона ГК на микроорганизмы. Однако данная система не в состоянии дать окончательную и полную картину антимутагенной активности, поскольку последняя может быть изменена в результате столь большого числа мутаций, искусственно введенных Эймсом для повышения чувствительности при конструировании штаммов.

Для проверки влияния ГК на репарационные процессы была поставлена серия опытов на УФ-чувствительность *E. coli*, диких и 6 штаммов, несущих повреждения по различным генам ферментов репарации (табл. 3). Результаты этих исследований представлены в табл. 3, согласно которой существует линейная зависимость между выживаемостью и дозой облучения. Наибольшую чувствительность к УФ-облучению проявили штаммы, несущие мутации по генам P3478—*polA1*, AB1885—*uvrB*, ДМ49—*lexA3*. Выживаемость этих штаммов при облучении УФ в дозе 750 эрг/мм² падает от двух раз до нескольких порядков соответственно.

У штаммов AB1885 *uvrA*, AB1881 *uvrC*, W3110 *pol⁺* ГК способствовала повышению УФ-чувствительности. При предварительной обработке 0,02%-ной ГК выживаемость штамма W3110 снижается до 50% (против 95% в контроле), а при дозе 750 эрг/мм² до 20% (против 37,5% в контроле), в то время как эта же доза у AB 1885, ДМ49, P3478 понижает УФ-чувствительность на 1 порядок.

Штаммы, проявившие указанный эффект, несут дефектные гены по регуляторным белкам, контролирующим работу специфических эндонуклеаз и гликозилаз—ключевых ферментов экзационной репарации, участвующих и в пострепликативной репарации.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии фитогормона ГК на протекание репарационных процессов, возможно, в результате взаимодействия с регуляторными белками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегларян Н. П. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1971.
2. Бегларян Н. П. Генетика, 9, 6, 1970.
3. Бегларян Н. П. Цитология и генетика, 4, 6, 1970.
4. Бегларян Н. П. Тез. докл. III съезда ВОТИС, Л., 1977.
5. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Тез. докл. I Всесоюз. конф. по регуляторам роста и развития растений, М., 1981.
6. Бегларян Н. П. Тез. докл. юбил. сессии, посвящ. 60-летию образования СССР, Ереван, 1982.
7. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 28, 10, 1975.
8. Бегларян Н. П., Мигуеян Э. Г., Топузян М. А. Тез. докл. XIV ежегодн. конф. Европ. общ-ва по мутагенам внешней среды, 55, М., 1984 г.
9. Бегларян Н. П., Саркисян С. А., Галстян А. Уч. зап. ЕГУ, 1, 1981.
10. Фонштейн Л. М., Клишина Л. М., Ползунова Г. Н., Абилов С. К., Шапиро Л. А. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (методическое указание), М., 1977.
11. Ames B. N. Plenum Press, 1, 267, 1971.

12. Ames B. N., Lee F. D. and Dunston W. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 782, 1973a.

13. Ames B. N., McCann Y., Yamasaki E. Mut. Res., 31, 347, 1975.

Ереванский государственный университет,
кафедра цитологии и генетики

Поступила 7.11.1985 г.

УДК 579.64.631+581.133.1

ПОЛУЧЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ АССОЦИАЦИИ КАЛЛЮСА ЛЮЦЕРНЫ СО СПЕЦИФИЧНЫМИ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Ю. Г. ПОПОВ, М. Г. ШАМЦЯН, Дж. А. АГАДЖАНИН, Т. А. ЗАКАРЯН

Получены азотфиксирующие ассоциации каллюса люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий. Хорошая выживаемость растительных клеток в указанных ассоциациях позволяет получать первичные ассоциативные культуры.

Ստացված են պարարակոերիաների սպեցիֆիկ շտամներով առվելուի կալլուսի ազոտ-
ֆիքսող ասոցիացիաներ: Ստացված ասոցիացիաներում բուսական բջիջների կենսունակությու-
նը լավանումը նախափորձում է ստեղծում ստանալու թիթենիամաղկափայտների և պարարակ-
ոերիաների տեսակն փոխանցողների ընթացքում պաշտպանող համատեղ կալուարաներ:

Nitrogen-fixing associations of alfalfa callus with specific nodule bacteria have been obtained. The high rate of plant cells viability in associations obtained permits to create well-subcultured associative systems.

Ключевые слова: люцерна, симбиотическая азотфиксация, каллюс, клубеньковые бактерии, нитрогеназная активность.

При моделировании симбиотической азотфиксации в культуре ткани перед исследователями встает множество трудноразрешимых проблем, к числу которых относятся ингибирование роста клеток растительного компонента бактериальным и низкая азотфиксирующая активность создаваемых ассоциаций по сравнению с природными системами. Решению этих вопросов посвящено небольшое число работ [1, 2, 5, 8, 9, 11—17]. Установлено, что ацетилредуктазная активность ассоциаций значительно варьирует в зависимости от исходного титра бактериальной нагрузки, возраста ткани к моменту инокулирования, сроков совместного культивирования компонентов ассоциации, состава среды, видовых и штаммовых различий клубеньковых бактерий, генотипических особенностей растительного компонента и др.

Целью наших исследований являлось получение азотфиксирующих ассоциаций культуры ткани люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий и определение условий, оптимальных для проявления их нитрогеназной активности.

Материал и методика. Объектами исследований служили штаммы *Rhizobium meliloti* 21/67 и 132/64, полученные из Института микробиологии АН АрмССР, и каллюсная культура люцерны сорта Апэранская 40 корневого происхождения [6]. Каллюс люцерны пассировался на среде МН-5 [4]. На этой же среде создавались и бобо-