



УДК 579.25

ВВЕДЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА *MU* В *AZOTOBACTER CHROOCCOSUM* И МЕЖРОДОВОЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ, ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ПЛАЗМИДОЙ *RP4::MU*

А. С. Расчинкина, Н. А. Троицкий, Л. А. Окулич

Бактериофаг *Mu*, внесенный в клетки устойчивых к нему грамтрицательных бактерий в составе трансмиссибельных плазмид, способен хорошо экспрессироваться во многих новых хозяевах [1—4]. Благодаря этому стало возможным его применение для создания эффективной системы конъюгационного переноса хромосомных генов [1, 2, 4—8].

Цель настоящей работы — введение бактериофага *Mu* в *Azotobacter chroococcum* и изучение донорных свойств полученного штамма в гетероспецифическом скрещивании с *Escherichia coli*.

Материалы и методы. Штаммы. Характеристика штаммов бактерий и бактериофагов представлена в табл. 1.

Реактивы. Минеральные соли, глюкоза и сахароза («Реахим», СССР), аминокислоты («Реапа», Венгрия), дрожжевой экстракт («Sergva», ФРГ), гидролизат казеина («Calbiochem», США), антибиотики — стрептомицина сульфат, тетрациклина гидрохлорид, ампициллина натриевая соль, канамицина сульфат — производства СССР.

Среды. Для выращивания *A. chroococcum* использовали агаризованную (1,5 %) среду Берка [9], жидкую и агаризованную среду Берка, обогащенную дрожжевым экстрактом, 1 г/л, и гидролизатом казеина, 1 г/л, (БДЭГК). Для выращивания *E. coli* применяли мясо-пептонный бульон (МПБ), 1,5- и 0,7 %-й мясо-пептонный агар (МПА) и минимальную агаризованную среду М9, обогащенную необходимыми факторами роста. Растворы антибиотиков готовили непосредственно перед опытом и вносили в селективные среды в следующих конечных концентрациях, мкг/мл: тетрацилин — 20, канамицин — 100, ампициллин — 100 для *E. coli* и соответственно 10, 5 и 100 для *A. chroococcum*. В МПА, используемый для титрования фага *Mu*, вносили $2,5 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 и 10^{-3} М MgSO_4 . Для разведения бактериальной суспензии *E. coli* применяли буферные растворы М9 и Берка для *Azotobacter*, т. е. соответствующие среды, лишённые углеводов.

Лизогенизация фагом *Mu cts62 E. coli C600 (RP4)*. Клетки *E. coli* лизогенизировали по методу [10] фагом *Mu cts62*, полученным после термоиндукции *E. coli* AB2463.

Продуцирование фага *Mu cts62* клетками *A. chroococcum*. Свежую культуру трансконъюганта, содержащего плазмиду *RP4::Mu cts62*, высевали в среду БДЭГК и растили с азацией в течение суток при 30 °С. Затем культуру делили на две части. Первую подвергали термоиндукции при 42 °С в течение 15—20 мин с последующим выращиванием 24 ч при 30 °С. Вторую часть культуры продолжали растить то же время в прежних условиях. Далее обе культуры хлороформировали, центрифугировали. Надосадочную жидкость титровали в чашках с МПА, содержащих индикаторную культуру *E. coli*. Чашки инкубировали при 42 °С. Подсчет негативных колоний производили на следующий день.

Скрещивание. Смесь донорных и реципиентных клеток в соотношении 1:1, содержащую по 10^9 клеток каждой культуры в экспоненциальной фазе роста (*E. coli* — 2,5 ч в МПБ, *A. chroococcum* — 24 ч в среде Берка), наносили на бактериальный фильтр, который помещали на 0,7 %-й МПА и инкубировали при 30 °С. Длительность инкуба-

дни составила 1 ч в скрещивании *E. coli* × *E. coli*, 3 ч в скрещивании *E. coli* × *A. chroococcum* и 20 ч в опытах по передаче хромосомных маркеров при скрещивании *A. chroococcum* × *E. coli*. В последнем случае перед приготовлением конъюгационной смеси производили термоиндукцию профага *Mu cts62* в клетках азотобактера, как указано выше. Клетки после смыва с фильтра высевали на селективные для реципиента среды. В качестве селективного признака при передаче плазмид использовали устойчивость к тетрациклину. Для определения передачи хромосомных маркеров в *E. coli* применяли сре-

Таблица 1
Бактериальные штаммы и бактериофаги
Bacterial Strains and Bacteriophages

Штамм	Характеристика	Источник получения
<i>Escherichia coli</i> K12 C600 (RP4)	<i>thr leu thi (Ap^rKm^rTc^r)</i>	Коллекция Опорного пункта ВНИИгенетика, Минск
C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	<i>thr leu thi (Ap^rKm^rTc^r Mu cts62)</i>	Данная работа, получен путем лизогенизации C600 (RP4) фагом <i>Mu cts62</i>
C600 5K	<i>thr leu thi rK-mK⁺</i> , чувствителен к фагу <i>Mu</i>	Коллекция ИХФ АН СССР, Москва
AB1157	<i>F-thr leu pro arg his thi lac gal ara xyl mil str</i> , чувствителен к фагу <i>Mu</i>	Коллекция Политехнического ин-та, Ленинград
AB1157 <i>Mu^r</i>	Устойчив к инфекции фагом <i>Mu</i> , по другим свойствам аналогичен AB1157	Данная работа, получен как спонтанный мутант AB1157
AB1157 (<i>Mu cts62</i>)	Лизоген по фагу <i>Mu cts62</i> , по другим свойствам аналогичен AB1157	Данная работа, получен путем лизогенизации AB1157 фагом <i>Mu cts62</i>
AB2463 (<i>Mu cts62</i>)	Лизоген по фагу <i>Mu cts62</i> , <i>recA</i> , по другим свойствам аналогичен AB1157	Коллекция Политехнического ин-та, Ленинград
<i>Azotobacter chroococcum</i> 93/56	Дикий тип, устойчив к инфекции фагом <i>Mu</i> , прототроф	Коллекция ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград
3/53	То же	То же
9/21	»	»
100/6	»	»
31/8	»	»
93/56 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	Содержит плазмиду RP4 :: <i>Mu cts62</i>	Данная работа, <i>E. coli</i> C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>) × <i>A. chroococcum</i> 93/56
3/53 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	То же	Данная работа, <i>E. coli</i> C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>) × <i>A. chroococcum</i> 3/53
9/21 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	»	Данная работа, <i>E. coli</i> C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>) × <i>A. chroococcum</i> 9/21
100/6 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	»	Данная работа, <i>E. coli</i> C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>) × <i>A. chroococcum</i> 100/6
31/8 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>)	»	Данная работа, <i>E. coli</i> C600 (RP4 :: <i>Mu cts62</i>) × <i>A. chroococcum</i> 31/8
Бактериофаги <i>Mu cts62</i>	Термоиндуцибельный мутант <i>Mu</i>	Данная работа, получен путем термоиндукции AB2463 (<i>Mu cts62</i>)
PRR1	Специфичен для штаммов с плазмидами группы несовместимости P1	Коллекция Опорного пункта ВНИИгенетика, Минск

ду М9, лишенную одной из необходимых аминокислот, с тетрациклином. Контрольная донора в скрещиваниях *E. coli* × *E. coli* и *A. chroococcum* × *E. coli* обеспечивалась внесением в селективную среду стрептомицина в концентрации 200 и 20 мкг/мл соответственно, в скрещивании *E. coli* × *A. chroococcum* — использованием безазотной среды Берка. Посевы инкубировали при 30 °С. Подсчет трансконъюгантов *E. coli* производили через 2 сут, *A. chroococcum* — через 3—4 сут. Передачу хромосомных маркеров учитывали через 4—5 сут.

Результаты и обсуждение. Перенос плазмиды *RP4::Mu cts62* от *E. coli* в клетки *A. chroococcum*. Рекомбинантная плазида *RP4::Mu cts62* получена нами по методу [11] путем лизогенизации фагом *Mu cts62* штамма *E. coli* C600 (*RP4*). Интеграция профага в *RP4* продемонстрирована явлением зиготной индукции при переносе плазмиды в нелизогенный *Mu*-резистентный реципиент *E. coli* AB1157 (ее передача снижалась ~ в 1000 раз по сравнению с *RP4*) и 100%-й совместной передачей антибиотикоустойчивости и профага в скрещивании с тем же реципиентом.

Таблица 2

Частота переноса плазмид *RP4::Mu cts62* и *RP4* из *E. coli* C600 в *A. chroococcum*

Frequencies of Transfer of Plasmid *RP4::Mu cts62* and *RP4* from *E. coli* C600 to Strains of *A. chroococcum*

Плазида	Штамм-реципиент	Частота переноса
<i>RP4::Mu cts62</i>	9/21	$1,7 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4</i>	9/21	$1,9 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4::Mu cts62</i>	31/8	$6,9 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4</i>	31/8	$1,7 \cdot 10^{-3}$
<i>RP4::Mu cts62</i>	100/6	$8,0 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4</i>	100/6	$4,2 \cdot 10^{-3}$
<i>RP4::Mu cts62</i>	93/56	$1,9 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4</i>	93/56	$3,7 \cdot 10^{-3}$
<i>RP4::Mu cts62</i>	3/53	$5,7 \cdot 10^{-4}$
<i>RP4</i>	3/53	$1,5 \cdot 10^{-3}$

Примечание. Частоту переноса определяли, как отношение числа трансконъюгантов к числу жизнеспособных клеток донора в начале скрещивания.

Таблица 3

Титр фага *Mu cts62* в культурах разных штаммов *A. chroococcum* по сравнению с *E. coli* AB2463 (*Mu cts62*)

The Phage *Mu cts62* Titer in the Cultures of Different Strains of *A. chroococcum* in Comparison with *E. coli* AB2463 (*Mu cts62*)

Штамм, продуцирующий фаг	Число негативных колоний на 1 мл
<i>A. chroococcum</i> *	
31/8 (<i>RP4::Mu cts62</i>)	$4,4 \cdot 10^5$
100/6 (<i>RP4::Mu cts62</i>)	$3,1 \cdot 10^5$
9/21 (<i>RP4::Mu cts62</i>)	$1,3 \cdot 10^5$
<i>E. coli</i> **	
AB2463 (<i>Mu cts62</i>)	$3,5 \cdot 10^8$

* Титр клеток в культуре $3 \cdot 10^8$. ** Культура росла до экспоненциальной фазы при 30 °С, затем индуцировалась 1 ч при 42 °С. К началу термоиндукции в культуре было $1,2 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл.

Штамм *E. coli* C600 (*RP4::Mu cts62*) использован в качестве донора для переноса плазмиды *RP4::Mu* в *A. chroococcum*. Одновременно для контроля и сравнения проводили опыты по переносу плазмиды *RP4* от донора C600 (*RP4*). Ранее нами показано, что плазида *RP4* переносится из *E. coli* в клетки *A. chroococcum* и стабильно наследуется ими, все гены антибиотикоустойчивости *RP4* экспрессируются в новом хозяине [12].

Как видно из данных табл. 2, плазмиды *RP4::Mu cts62* и *RP4* передаются в пять штаммов азотобактера почти с одинаковой частотой 10^{-4} — 10^{-3} . Сходство частот переноса обеих плазмид свидетельствует об отсутствии значительной зиготной индукции профага *Mu* в клетках *A. chroococcum*.

Согласно данным литературы, зиготная индукция зависит от реципиентных бактерий. В одни бактерии плазида с фагом *Mu* передается с более низкой частотой, чем плазида без *Mu* [3, 11, 13], в другие — с той же частотой, т. е. без зиготной индукции [4, 14]. Отсутствие зиготной индукции при передаче плазмиды *RP4::Mu* рассматривается как один из важных факторов, определяющих перспективность ее

использования для разработки методов конъюгационного генетического анализа у бактерий [4].

Трансконъюганты азотобактера, получившие плазмиду с фагом *Mu*, имеют фенотипическую особенность — замедленный рост на селективной среде и гораздо более мелкие колонии по сравнению с получившими плазмиду *RP4*. Подобное явление у *R. meliloti*, получивших фаг *Mu* с плазмидой *RP4*, авторы объясняют проявлением некоторых генов *Mu* или увеличением плазмиды [11].

Таблица 4

Передача хромосомных маркеров от *A. chroococcum* 31/8 в *E. coli* AB1157, обусловленная плазмидами *RP4*: : *Mu cts62* и *RP4*

Transfer of Chromosomal Markers from *A. chroococcum* 31/8 to *E. coli* AB1157 by Plasmids *RP4*: : *Mu cts62* and *RP4*

Донорный штамм	Частота переноса плазмиды*	Селективные маркеры	Частота спонтанных ревертантов	Частота передачи селективных маркеров*
31/8 (<i>RP4</i> : : <i>Mu cts62</i>)	10^{-2}	<i>thr Tc</i>	$2,6 \cdot 10^{-8}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$ — $5,1 \cdot 10^{-3}$
	—	<i>his Tc</i>	$2,4 \cdot 10^{-9}$ — $1,1 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$ — $3,3 \cdot 10^{-3}$
	—	<i>pro Tc</i>	$2,3 \cdot 10^{-9}$	не передается
31/8 (<i>RP4</i>)	1	<i>thr Tc</i>	$2,6 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^{-6}$ — $4,6 \cdot 10^{-5}$
	—	<i>his Tc</i>	$2,4 \cdot 10^{-9}$ — $1,1 \cdot 10^{-8}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$ — $2,4 \cdot 10^{-5}$
	—	<i>pro Tc</i>	$2,3 \cdot 10^{-9}$	не передается

* Частоту определяли, как отношение числа трансконъюгантов к числу жизнеспособных клеток донора в начале скрещивания. Приведены данные трех опытов.

Продуцирование фага *Mu cts62* клетками *A. chroococcum*. Фагопродукция исследована в культурах отдельных клонов (до 16) пяти штаммов азотобактера, получивших плазмиду *RP4*: : *Mu cts62*. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *E. coli* C600 5K. Спонтанный выход фага выявлен в культурах пяти клонов штамма 31/8, трех клонов штамма 9/21 и двух клонов штамма 100/6. В культурах трансконъюгантов штаммов 93/56 и 3/53 фаг не был обнаружен. По титру фага фагопродуцирующие культуры существенно не различались (табл. 3). Фаг, выделенный из этих культур, обладает специфичностью, характерной для *Mu*, поскольку он формировал негативные колонии только на *Mu*-чувствительных и нелизогенных по *Mu* штаммах *E. coli* и не формировал их на *Mu*-резистентных и лизогенных по *Mu* штаммах. Интересно отметить, что применение термоиндукции (20 мин при 42 °С) у всех исследованных культур азотобактера не способствовало значительному повышению выхода фага по сравнению со спонтанным.

Перенос хромосомных маркеров азотобактера плазмидой *RP4*: : *Mu cts62*. Обнаруженная нами экспрессия фага *Mu* в клетках азотобактера дает основание предположить возможность транспозиции его генов на плазмиду и их конъюгационного переноса в другие бактерии-реципиенты. В качестве реципиента был взят штамм *E. coli* AB1157, устойчивый к фагу *Mu*. Донором служил штамм *A. chroococcum* 31/8, несущий плазмиду *RP4*: : *Mu cts62*. Для сравнения в тех же экспериментах использовали донорный штамм *A. chroococcum* 31/8 с плазмидой *RP4*. Мы исследовали способность генов азотобактера, перенесенных в *E. coli* AB1157, восстанавливать прототрофность по генам *thr*, *his* и *pro*. Для одновременной селекции генов азотобактера и плазмидных маркеров устойчивости в качестве селективных сред применяли среды на основе M9 с тетрациклином без одной из аминокислот (треонина, гистидина или пролина), необходимых для штамма AB1157. Для контрселекции донора использовали стрептомицин.

На селективных средах без треонина и гистидина с тетрациклином трансконъюганты появлялись с высокой частотой — 10^{-3} — 10^{-4} на клетку донора с плазмидой *RP4: :Mu*, в 100 раз превышающей частоту трансконъюгантов в опытах с использованием донора с плазмидой *RP4* (табл. 4). Транskonъюгантов с фенотипом *Pro⁺Tc^r* в обоих случаях не обнаружено. Для *Thr⁺Tc^r*-трансконъюгантов, полученных в скрещивании с донором *RP4: :Mu cts62*, характерен медленный рост и мелкие колонии. При расщепе их на селективной среде выявлена сегрегация быстро растущих клонов ($\sim 1\%$). Транskonъюганты *Thr⁺Tc^r* получили от донора также плазмидные гены и профаг *Mu cts62*, так как они были устойчивы к соответствующим антибиотикам, чувствительны к фагу *PRR1* и продуцировали после термoinдукции бактериофаг *Mu*.

Стабильность *Thr⁺Tc^r*-трансконъюгантов *E. coli* изучали после 40 генераций в неселективных условиях (выращивание в МПБ с последующим высевом на полную среду М9 для получения изолированных клонов). Чтобы выявить наличие маркеров *thr* и устойчивость к трем антибиотикам, исследовано по 100 клонов десяти трансконъюгантов из каждого опыта. При этом выявлено, что до 20% клонов теряли признак *Thr⁺*, сохраняя все плазмидные маркеры. Эти данные свидетельствуют о том, что хромосомные маркеры азотобактера сегрегируют в новом хозяине легче, чем плазмидные. Стабильные клоны *Thr⁺Tc^r*-трансконъюгантов *E. coli* обладали донорными свойствами и передавали совместную плазмиду и *thr*-маркер в скрещиваниях с реципиентами *E. coli AB1157 Mu^r* и *E. coli AB2463 (Mu cts)*. Оба реципиента — спонтанные ревертаны по маркеру *arg*. Контрелекция донора в этих опытах достигалась отсутствием в среде аргинина. Такой характер передачи предполагает включение *thr*-маркера в плазмиду. Транskonъюганты *His⁺Tc^r* также образовывали на селективной среде мелкие колонии.

Эти трансконъюганты утрачивали *His⁺*-признак в 100% случаев уже при первом пересеве на селективную среду без предварительного выращивания в неселективных условиях.

В конъюгационной системе *A. chroococcum 31/8* × *E. coli AB1157 Mu^r* при использовании донора с *RP4: :Mu cts62* создается возможность транспозиции хромосомных маркеров азотобактера на плазмиду, которая осуществляет их передачу в клетки реципиента с большей частотой, чем *RP4* без *Mu*. Как видно из данных табл. 4, плаزمида *RP4: :Mu cts62* передается в *E. coli* с меньшей частотой, чем *RP4*, в то время как частота передачи маркеров *thr* и *his*, обусловленная ею, в среднем в 10^5 — 10^4 раз выше (в расчете на переданную плазмиду). Передача хромосомных маркеров плазмидой *RP4: :Mu* при других межродовых скрещиваниях осуществлялась с более низкой частотой [2, 6, 8].

Сходство частот передачи маркеров *thr* и *his* может свидетельствовать о равной вероятности включения *Mu* в различные участки хромосомы азотобактера и транспозиции генов на введенную плазмиду. Судьба этих генов в клетках *E. coli* неодинакова. Ген *thr* частично восстанавливает функцию аналогичного мутантного гена *E. coli AB1157*, о чем свидетельствует формирование мелких колоний трансконъюгантов на селективной среде. Как уже отмечалось, этот ген довольно стабильно поддерживается в составе плазмиды. Сегрегация клонов с полным восстановлением *Thr⁺*-фенотипа (быстро растущие клоны), возможно, объясняется гомологией отдельных сегментов ДНК *A. chroococcum* и *E. coli*, как это показано для *argH*-гена дрожжей, клонированного в клетках *E. coli* [15].

Ген *his* азотобактера экспрессируется в *E. coli* слабее *thr*-гена и полностью элиминируется из клеток нового хозяина. Недостаточная экспрессия и нестабильность чужеродной ДНК при гетероспецифическом переносе известна [8, 15]. Однако причины спонтанной элиминации *his*-маркера из *His⁺Tc^r*-трансконъюгантов и отсутствия передачи

pro-маркера, обнаруженные нами, остаются неясными и требуют изучения.

Дальнейшие генетические исследования на *A. chroococcum* с применением плазмиды *RP4::Mu*, на наш взгляд, необходимо проводить как в направлении стабилизации плазмид, несущих фрагменты его ДНК, так и в направлении создания возможности мобилизации хромосомы этой бактерии в конъюгационных скрещиваниях.

INTRODUCTION OF *MU* BACTERIOPHAGE INTO *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* AND INTERGENERIC *RP4::Mu* PLASMID-MEDIATED TRANSFER OF GENES

A. S. Raschinkina, N. A. Troitsky, L. A. Okulich

Institute of Genetics and Cytology,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

Recombinant plasmid of *RP4::Mu cts62* is constructed. The plasmid is transferred by conjugation with the 10^{-3} - 10^{-4} frequency from *E. coli* to taxonomically nonrelated bacterium of *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter* strains are revealed where *Mu cts62* phage DNA was replicated and about 10^5 plaque-forming units per ml⁻¹ was produced. The strain of *A. chroococcum* 31/8 (*RP4::Mu cts62*) is used as a donor of chromosomal genes in intergeneric mating with *E. coli* AB1157 recipient. The *RP4::Mu cts62* plasmid-mediated transfer of *thr* and *his* markers is found.

1. Potential of *RP4::Mu* plasmids for *in vivo* genetic engineering of gram-negative bacteria / J. Denarie, C. Rosenberg, B. Bergeron et al.—In: DNA insertion elements, plasmids and episomes. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1977, p. 507—520.
2. Murooka Y., Takizawa N., Harada T. Introduction of bacteriophage *Mu* into bacteria of various genera and intergeneric gene transfer by *RP4::Mu*.—J. Bacteriol., 1981, 145, N 1, p. 358—368.
3. Beacham J. R., Garrett S. Transfer of *RP4::Mu* to *Salmonella typhimurium*.—J. Gen. Microbiol., 1981, 124, N 1, p. 225—228.
4. Конъюгация у *Rhodospseudomonas sphaeroides*, обусловленная R-плазмидами / С. В. Каменева, Т. П. Поливцева, А. В. Коптева, Е. М. Муронец.—Генетика, 1982, 18, № 9, с. 1433—1441.
5. Perombelon M. C. M., Boucher C. Developing of mating system in *Erwinia carotovora*.—In: Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathog. Bact. Angers, 1978, v. 1, p. 47—52.
6. Gijsegem F. Van., Toussaint A. Chromosome transfer and R-prime formation by an *RP4::mini-Mu* derivative in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*.—Plasmid, 1982, 7, N 1, p. 30—44.
7. Schoonejans E., Toussaint A. Utilization of plasmid *pULB113 (RP4::mini-Mu)* to construct a linkage map of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemii*.—J. Bacteriol., 1983, 154, N 3, p. 1489—1492.
8. Chromosome transfer and R-prime plasmid formation by plasmid *pULB113 (RP4::mini-Mu)* in *Alcaligenes eutrophus CH34* and *Pseudomonas fluorescens 6.2/P*. Lejeune, M. Mergeay, van F. Gijsegem et al.—Ibid, 155, N 3, p. 1015—1026.
9. Sadoff H. L., Shimei B., Ellis S. Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes.—Ibid, 1979, 138, N 3, p. 871—877.
10. Taylor A. L. Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1963, 50, N 6, p. 1043—1051.
11. Introduction of bacteriophage *Mu* into *Pseudomonas solanacearum* and *Rhizobium meliloti* using the R factor *RP4* / C. Boucher, B. Bergeron, de M. B. Bartalmino, J. Denarie.—J. Gen. Microbiol., 1977, 98, N 2, p. 253—263.
12. Расчынкіна А. С., Тройцкі М. А., Акуліч Л. А. Перанос плазміды *RP4* пры канъюгацыі і выражэння яе генаў у *Azotobacter chroococcum*.—Весті Акад. навук БССР, сер. біял. навук, 1981, № 3, с. 64—68.
13. Transfer of *RP4::Mu* plasmids to *Agrobacterium tumefaciens* / Van F. Vliet, B. Silva, van M. Montagu, J. Schell.—Plasmid, 1978, 1, N 4, p. 446—455.
14. Tucker W. T., Pemberton J. M. The introduction of *RP4::Mu cts62* into *Rhodospseudomonas sphaeroides*.—FEMS Microbiol. Lett., 1979, 5, N 3, p. 215—217.
15. Clarke L., Carbon J. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*: specific complementation of argininosuccinate lyase (*arg H*) mutations.—J. Mol. Biol., 1978, 120, N 4, p. 517—532.

Ин-т генетики и цитологии АН БССР,
Минск

Получено 17.08.84