

Н.А. Проворов, И.Г. Фокина,
М.Л. Румянцева, Б.В. Симаров

Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии
Россельхозакадемии,
Санкт-Петербург

✿ При переносе *Sym*-плазмид ризобий клевера в асимбиотические мутанты этого же вида ризобий, а также ризобий люцерны получены рекомбинанты, у которых восстановилась способность к азотфиксирующему симбиозу с бобовыми растениями. При переносе этих плазмид в изогенные штаммы дикого типа наблюдали снижение их симбиотической активности. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что асимбиотические штаммы ризобий играют важную роль в переносе *Sym*-плазмид, который определяет эволюцию этих бактерий.

✿ **Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, бобовые растения, хозяйская специфичность, *Sym*-плазмиды, эволюция симбиоза, азотфиксирующая активность, агробактерии, перенос генов.

ПЕРЕНОС *Sym*-ПЛАЗМИД В СИМБИОТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ И АСИМБИОТИЧЕСКИЕ ШТАММЫ РИЗОБИЙ: СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТОВ И ВОЗМОЖНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

ВВЕДЕНИЕ

У большинства быстрорастущих клубеньковых бактерий (ризобий) способность к симбиозу с бобовыми растениями кодируется *Sym*-плазмидами (*pSym*), размер которых у *Rhizobium* обычно составляет 100–300 т.п.н., а у *Sinorhizobium* достигает 1700 т.п.н. [19]. Эти плазмиды в совокупности с криптическими («несимбиотическими») плазмидами (до 10 на штамм) составляют до 50% бактериального генома. Перенос *pSym* играет важную роль в формировании популяций ризобий, о чем говорит часто выявляемое равновесие по сцеплению (свободное комбинирование) маркеров *Sym*-плазмид и хромосомы [18]. В *Sym*-плазмидах (*Sino*) *Rhizobium* и в *Ti(Ri)*-плазмидах родственных им агробактерий обнаружены обширные области гомологии, которые содержат гены конъюгативного переноса и репликации. Это свидетельствует об общности происхождения данных плазмид и о важной роли их переноса в эволюции бактерий сем. *Rhizobiaceae* [12].

В то же время, в лабораторных условиях у большинства *Sym*-плазмид трансмиссивность не проявляется, либо частоты переноса малы [12], в связи с чем их мобилизация может быть осуществлена только с использованием гетерологичных систем, например *Tn5-mob*+*pRP4-4* [24]. Поэтому логично предположить, что «подвижность» этих плазмид в природных популяциях определяется факторами, не связанными с высокой частотой конъюгативного переноса. К их числу может быть отнесено действие отбора в пользу рекомбинантов, которые приобрели *Sym*-плазмиды. Действительно, при переносе этих плазмид между разными видами ризобий, а также в другие микроорганизмы (*Agrobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*), часто возникают рекомбинанты, способные колонизировать растения-хозяева донорного штамма [3, 13]. Однако степень проявления признаков, кодируемых *Sym*-плазмидами, может быть ограничена несовместимостью плазмид (при внутривидовых скрещиваниях) или отсутствием экспрессии перенесенных генов на чужеродном генетическом фоне (при межвидовых скрещиваниях) [3, 13, 19, 25].

Известно, что в природных экосистемах широко распространены асимбиотические (невирулентные) штаммы ризобий, которые иногда составляют более 90% от общей численности популяций [23]. У *Rhizobium* и *Sinorhizobium* их накопление происходит за счет утраты *pSym* и приводит к формированию экотипически полиморфных популяций, в которых стабильно сосуществуют симбиотически активные и неактивные штаммы. Ранее [4] было высказано предположение о том, что авирулентные штаммы ризобий

играют роль основных «посредников» в природной миграции *pSym*, поскольку: 1) проявление переносимых генов не ограничено несовместимостью плазмид донора и реципиента; 2) перенос *Sym*-плазмид сопровождается приобретением способности инфицировать растения, которое определяет расширение адаптивного потенциала рекомбинантов. Справедливость этого предположения может быть оценена путем анализа наследования признаков, кодируемых *Sym*-плазмидами, при их переносе в генетически родственные симбиотические и асимбиотические штаммы. Для решения этой задачи мы использовали *Sym*-плазмиды ризобий клевера (*R. leguminosarum* *bv. trifolii*), которые переносили в пределах этого же вида бактерий, а также в ризобии люцерны и в агробактерии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы 343 и 345а клубеньковых бактерий клевера (*Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*) получены из Всероссийской коллекции клубеньковых бактерий ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Мы маркировали их мутациями устойчивости к рифампицину (Rif^r), высевая на среду 79 [9] с этим антибиотиком (частота возникновения мутантов 10^{-8} – 10^{-9} на клетку). Авирулентный мутант СХМ1-46 клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) получен после обработки УФ-лучами высокоактивного устойчивого к стрептомицину штамма СХМ1 [6]. От этого же штамма получены УФ-мутанты СХМ1-105 и СХМ1-214, обладающие повышенной симбиотической эффективностью (Eff⁺). GM19023 *Agrobacterium tumefaciens* — невирулентный, лишенный Ti-плазмиды мутант, который благодаря близкому родству с *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, широко используется как реципиент *Sym*-плазмид при изучении их переноса и экспрессии кодируемых симбиотических признаков [10, 22].

Маркирование плазмид транспозоном Tn5-*mob* и их последующую мобилизацию проводили с помощью не-реплицирующегося в ризобиях вектора *pSUP5011*; штамм-донор транспозона S17-1 *Escherichia coli* получен из отдела генетики Билефельдского университета, ФРГ [24].

Для культивирования ризобий и проведения конъюгации использовали твердую агаризованную (15 г/л агар-агара) среду 79 с добавлением 10 мл/л аминокептида (не поддерживает рост *E. coli*). Антибиотики, необходимые для отбора мутантов и рекомбинантов, добавляли в следующих концентрациях (мг/л среды): стрептомицин — 800, канамицин — 200, рифампицин — 40, тетрациклин — 10.

Симбиотические свойства бактерий оценивали в условиях стерильных микровеgetационных [6] и вегетационных [5] опытов (повторность 8–10-кратная). Нитрогеназную активность определяли ацетиленовым методом, эффективность симбиоза — по сухой массе надземной части растений. Семена клевера лугового (*Trifolium pratense*, с. Сиворецкий), клевера сходного (*T. ambiguum*, дикорастущий образец N 38440) и люцерны изменчивой (*Medicago varia*, с. Зайкевича) получены из отдела кормовых культур ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. Для статистической обработки использовали метод однофакторного дисперсионного анализа, а также *t*-критерий Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Идентификация *Sym*-плазмид *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*

Для маркировки и последующей мобилизации *Sym*-плазмид штаммов 343 и 345а ризобий клевера (*R. leguminosarum* *bv. trifolii*) в них вводили транспозон Tn5-*mob* из штамма S17-1 *E. coli* (частота возникновения устойчивых к канамицину (Km^r) транспозантов — 10^{-6}), после чего в независимо полученные транспозанты вводили плазмиду-помощник *pRP4-4*. Для идентификации *Sym*-плазмид использовали предложенную ранее [7] методику, основанную на их переносе в невирулентный мутант СХМ1-46 ризобий люцерны (*S. meliloti*). Способность этого мутанта формировать азотфиксирующие клубеньки на люцерне восстанавливается при переносе в него *Sym*-плазмид из *R. leguminosarum* [8], что может быть связано с нарушением у СХМ1-46 «общих» генов вирулентности, гомологичных у всех ризобий.

Таблица 1

Перенос *Sym*-плазмид ризобий клевера в авирулентный мутант СХМ1-46 ризобий люцерны и в агробактерии

Штамм-донор	Количество транспозантов донора, которые			Частоты переноса <i>Sym</i> -плазмид из <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i> (на клетку реципиента)*		Размер <i>Sym</i> -плазмиды (т.п.н.)
	скрещивали с СХМ1-46	передавали в СХМ1-46 (в присутствии <i>pRP4-4</i>)		В СХМ1-46 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	В GM19023 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
		маркер Km ^r	способность формировать клубеньки на люцерне (совместно с Km ^r)			
343	76	10	4	0.8-2.2Ч10-7	2.6-8.0Ч10-7	320
345а	20	4	2	1.0Ч10-9-1.0Ч10-8	1.1-1.3Ч10-8	270

Примечание: * — В отсутствие *pRP4-4* перенос маркера Km^r из транспозантов ризобий клевера в мутант СХМ1-46 не наблюдали (частота менее 10⁻¹¹).

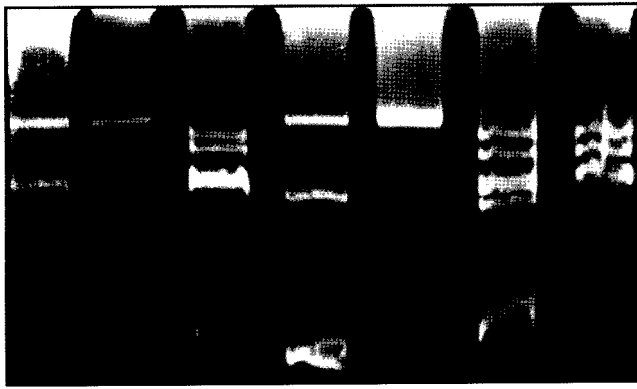


Рис. 1. Выявление *Sym*-плазмид ризобий клевера (штаммы 343 и 345а) при их утрате или переносе в невирулентный мутант СХМ1-46 ризобий люцерны

1 — СХМ1-46::pSym343 (рекомбинант, у которого восстановилась способность к симбиозу); 2, 5 — СХМ1-46 (невирулентный мутант); 3 — 343::pRP4-4 (симбиотически активный штамм «дикого типа»); 4 — СХМ1-46::pSym345а (рекомбинант, у которого восстановилась способность к симбиозу); 6 — 345а::pRP4-4 (симбиотически активный штамм «дикого типа»); 7 — 345аDpSym345а (асимбиотический мутант, утративший *Sym*-плазмиду [7])

Мы выявили 10 транспозантов штамма 343, которые в присутствии pRP4-4 передавали (с частотой не менее 10^{-7}) маркер Km^r в мутант СХМ1-46. Для 4 транспозантов эта передача сопровождалась восстановлением у мутанта СХМ1-46 способности формировать азотфиксирующие клубеньки на люцерне (см. табл. 1). Предположение о том, что у этих 4 транспозантов Tn5-mob встроился в *Sym*-плазмиду, было подтверждено тем, что перенос маркера Km^r в штамм GM19023 *A. tumefaciens* (частота 10^{-4} – 10^{-6}) сопровождался приобретением способности формировать клубеньки на клевере. Передача маркера Km^r из остальных 6 транспозантов штамма 343 в мутант СХМ1-46 не восстанавливала его способность к симбиозу с люцерной, что говорит о встройке Tn5-mob в «несимбиотические» плазмиды. Действительно, перенос этих плазмид в

штамм GM19023 *A. tumefaciens* не приводил к появлению у него симбиотической активности.

Электрофоретический анализ симбиотически активных рекомбинантов штамма СХМ1-46 показал, что все они содержат (в дополнение к имеющимся у *S. meliloti* мегаплазидам) меньшую из 3 выявленных у штамма 343 плазмид (эта плазида, имеющая размер 320 т.п.н., обозначена pSym343), тогда как невирулентные рекомбинанты содержат дополнительные плазмиды, соответствующие большим по размеру плазидам штамма 343. Аналогичным образом была выявлена *Sym*-плазида штамма 345а, размер которой составил 270 т.п.н. (рис. 1).

2. Симбиотическая активность рекомбинантов, полученных при переносе *Sym*-плазмид

Все транспозанты штаммов 343 и 345а, содержащие инсерции Tn5-mob в *Sym*-плазидах, сохранили способность к эффективному симбиозу с клевером, что позволило использовать маркированные плазмиды для анализа экспрессии кодируемых симбиотических признаков в различных реципиентах. Выяснилось, что рекомбинанты авирулентного мутанта СХМ1-46, у которых способность к симбиозу с люцерной восстановилась благодаря приобретению pSym343 или pSym345а, уступали по эффективности симбиоза с люцерной штамму СХМ1 — родителю СХМ1-46 (табл. 2). Мы предположили, что это связано с нарушением у реципиента экспрессии генов, контролирующих азотфиксацию. В пользу данного предположения говорит снижение симбиотической эффективности у рекомбинантов, полученных при введении pSym343 в штаммы СХМ1-105 и СХМ1-214 (см. табл. 2).

У большинства рекомбинантов, полученных при переносе pSym343 или pSym345а в симбиотически активные штаммы ризобий клевера, нитрогеназная активность и эффективность снижена (табл. 3), что может быть связано с функциональной несовместимостью плазмид родительских штаммов. В то же время рекомбинанты, возникшие

Таблица 2

Симбиотическая активность рекомбинантов, полученных при переносе плазмиды pSym343 в клубеньковые бактерии люцерны

Опыты*	Реципиент плазмиды pSym343	Сухая масса растений люцерны, инокулированных**				
		СХМ1	Рекомбинантами	Реципиентом	Контроль без инокуляции	НСР _{0.05}
1 (мв)***	СХМ1-46	10.9	7.1	5.8	5.5	0.51
2 (мв)	СХМ1-105	16.4	13.0	17.8	10.2	2.03
	СХМ1-214		14.1	18.6		
3 (в)	СХМ1-105	12.1	9.9	10.9	10.4	1.35
	СХМ1-214		10.2	12.2		

Примечания: * — мв — микроvegetационные опыты (изучали по 10 рекомбинантов, полученных от каждого реципиента), в — вегетационный опыт (по 4 рекомбинанта от каждого реципиента);

** — мг на пробирку для микроvegetационных опытов, г на сосуд для вегетационного опыта;

*** — ацетилен-редуктазная активность в опыте 1 составила (в мкМ C₂H₄ на пробирку в сутки): 1,81 для рекомбинантов СХМ1-46::pSym343; 2,48 для СХМ1; НСР_{0.05} = 0,664.

Таблица 3

Свойства рекомбинантов, полученных при введении плазмид pSym343 и pSym345a в симбиотически активные штаммы ризобий клевера

Реципиент	Введенная плаزمид	Изучено рекомбинантов	Сравнение рекомбинантов с реципиентом (Р)			
			По нитрогеназной активности		По симбиотической эффективности	
			=Р	<Р	=Р	<Р
345a	pSym343	16	10	6	8	8
343	pSym345a	4	0	4	0	4

Таблица 4

Наследование специфичности *R. leguminosarum* *bv.* *trifolii* по отношению к клеверу сходному (*T. ambiguum*) при переносе Sym-плазмид

Штаммы	Проанализировано растений <i>T. ambiguum</i>	% растений, на которых образовались клубеньки
343*	42	26,2+6,79
345a*	46	63,0+7,12
345a::pSym343**	150	35,3+3,90
343::pSym345a**	189	54,5+3,62

Примечания: * — Исходные штаммы не различались по специфичности в отношении *T. pratense* (формировали клубеньки у 100% растений)
 ** — Рекомбинанты, полученные при переносе pSym345a (или pSym343) в авирулентные, лишенные собственных Sym-плазмид мутанты штаммов 343 (или 345a)

при переносе pSym345a в асимбиотический, лишенный собственной Sym-плазмиды мутант штамма 343 (получен путем температурной обработки [7]), не отличались по симбиотической активности симбиоза от штамма 343. Рекомбинанты, полученные в реципрокных скрещиваниях (перенос pSym343 в невирулентный мутант 345aDpSym345a, см. рис. 1), обладали повышенной эффективностью: в микроvegetационном опыте масса растений клевера лугового, инокулированных рекомбинантами, составила 20,6–22,4 мг/пробирку, тогда как масса растений, инокулированных 345a — 16,7 мг/пробирку ($НСП_{0,05} = 2,23$ мг).

3. Наследование хозяйской специфичности при переносе Sym-плазмид

Для анализа роли pSym343 и pSym345a в определении хозяйской специфичности *R. leguminosarum* *bv.* *trifolii* мы изучили симбиотические свойства рекомбинантов, полученных при переносе этих плазмид, на двух видах клевера: луговом (*Trifolium pratense*) и сходном (*T. ambiguum*). Выбор данных растений обусловлен тем, что *T. ambiguum* отличается от *T. pratense* гораздо большей избирательностью по отношению к ризобиям, образуя клубеньки лишь с ограниченным спектром штаммов [15, 16].

Рекомбинанты, полученные при переносе pSym343 или pSym345a в *S. meliloti*, не проявили способности к симбиозу с клевером. Рекомбинанты, полученные при переносе этих плазмид в *A. tumefaciens*, формировали на *T. pratense* мелкие не фиксирующие азот клубеньки, но не формировали клубеньки на *T. ambiguum*.

Штаммы 343 и 345a *R. leguminosarum* *bv.* *trifolii* различались по способности к симбиозу к *T. ambiguum*:

доля растений, образующих клубеньки со штаммом 345a, в 2,4 раза выше, чем с 343 (табл. 4). Для изучения роли Sym-плазмид в контроле этого различия мы вводили pSym345a или pSym343 в невирулентные, лишенные собственных Sym-плазмид мутанты штаммов 343 и 345a, полученные путем температурной обработки. Анализ полученных рекомбинантов показал, что их специфичность к *T. ambiguum* наследуется совместно с переносимыми плазмидами (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Общая цель нашей работы состояла в оценке роли асимбиотических штаммов ризобий, составляющих значительную часть их популяций, в переносе Sym-плазмид, который играет важную роль в эволюции этих бактерий. Для этого мы изучили: а) возможность переноса Sym-плазмид из штаммов 343 и 345a клубеньковых бактерий клевера (*Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*) в симбиотически активные и асимбиотические штаммы этого вида бактерий, а также в ризобии люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) и в агробактерии; б) наследование кодируемых симбиотических свойств (способности формировать клубеньки, азотфиксирующей активности, хозяйской специфичности), которые определяют селективную ценность возникающих рекомбинантов.

Оказалось, что перенос в *S. meliloti* плазмид pSym343 или pSym345a, маркированных Tn5-mob, происходил только в присутствии плазмиды-помощника pRP4-4 с частотами не более 10^{-6} на клетку реципиента (см. табл. 1). В то же время ранее мы [7] показали возможность переноса этих плазмид из ризобий клевера в авирулентный мутант

СХМ1-46 без использования системы Tn5mob+pRP4-4: при инокуляции люцерны смесью изучаемых штаммов наблюдали образование азотфиксирующих клубеньков, из которых выделялись рекомбинанты штамма СХМ1-46, содержащие Sym-плазмиды *R. leguminosarum* *bv. trifolii*. Эти данные показывают, что в присутствии растений либо создаются условия для отбора редко возникающих рекомбинантов (которые, в отличие от донора и реципиента, способны формировать клубеньки на люцерне), либо повышается частота переноса плазмид. Активация переноса Sym-плазмид ризобий в ризосфере и клубеньках бобовых показана рядом авторов [8, 11, 21]. У агробактерий, составляющих единую таксономическую группу с *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, перенос Ti-плазмид происходит при активации *tra/trb*-генов опинами, которые синтезируются в растительных опухолях [12].

Мы показали, что у большинства рекомбинантов, возникших при переносе плазмид pSym343 или pSym345a в штаммы *R. leguminosarum* *bv. trifolii* «дикого типа», наблюдается нарушение симбиотической активности (см. табл. 3). Ранее подобные нарушения (функциональная несовместимость Sym-плазмид) были выявлены при гибридизации ризобий клевера и родственных им ризобий гороха [25]. В то же время при переносе pSym343 и pSym345a в невирулентные лишённые собственных Sym-плазмид штаммы *R. leguminosarum* *bv. trifolii* их симбиотическая активность полностью восстанавливалась или даже повышалась. Аналогичные результаты получены и при переносе Sym-плазмид из ризобий клевера в симбиотически активные и асимбиотические штаммы ризобий люцерны (см. табл. 2).

Изученные нами плазмиды играют важную роль в контроле хозяйской специфичности ризобий: при реципрокном обмене штаммов 343 и 345a Sym-плазмидами наблюдали наследование различий по способности к симбиозу с *T. ambiguum* — видом клевера, обладающим высокой избирательностью по отношению к штаммам *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (табл. 4). Однако проявление хозяйской специфичности зависит от реципиента: при переносе pSym в ризобии люцерны способность к симбиозу с клевером не проявляется, а при их переносе в агробактерии проявляется лишь частично (образование не фиксирующих азот клубеньков).

Полученные данные показывают, что перенос Sym-плазмид в симбиотически активные и асимбиотические штаммы ризобий вызывает разнонаправленные изменения их экологической приспособленности. У асимбиотических штаммов наблюдается повышение приспособленности (связанное с восстановлением способности к симбиозу, а при внутривидовых скрещиваниях — также и с наследованием хозяйской специфичности), а у симбиотически активных штаммов — ее уменьшение (снижение азотфиксирующей активности). Поскольку в популяциях ризобий асимбиотические штаммы весьма мно-

гочисленны [2, 23], логично предположить, что они играют важную роль в природной миграции pSym, так как возникающие рекомбинанты (в отличие от рекомбинантов, получаемые при переносе pSym в симбиотически активные штаммы) могут быть поддержаны отбором. Действительно, штаммы ризобий, способные формировать клубеньки, поддерживаются в популяциях путем индивидуального или частот-зависимого отбора (клональное размножение *in planta*), а штаммы, способные к симбиотической азотфиксации — благодаря отбору родичей (связанному с активным снабжением азотфиксирующих клубеньков продуктами фотосинтеза) [2, 17, 20].

Результаты нашей работы согласуются с предложенной ранее [4] схемой формирования типичных (экологически полиморфных, панмиктичных) популяций ризобий, которая включает: 1) накопление асимбиотических мутантов, утративших pSym; 2) перенос в эти мутанты pSym из симбиотически активных штаммов; 3) размножение возникающих рекомбинантов *in planta*. Сходная стратегия микроэволюции (*gain/loss*), основанная на постоянно происходящих утратах и переносах плазмид (островков) патогенности, характерна для многих бактериальных патогенов животных и человека [14]. Очевидно, что мутанты, утратившие способность к взаимодействию с хозяевами, играют роль основных «посредников» при переносе генов симбиоза, который обеспечивает высокую скорость эволюции симбиотических бактерий.

Авторы признательны К.В. Квитко за обсуждение рукописи.

Работа поддержана грантами Президента России (НШ-1103.2003.4) Американского фонда гражданских исследований и развития, CRDF (ST-012-0), а также РФФИ (03-04-49555).

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия (4-е издание). — М., Высш. школа, 1990. — 352 с.
2. Проворов Н.А. Популяционная генетика клубеньковых бактерий // Журн. общ. биологии. — 2000. — Т. 61. — № 3. — С. 229–257.
3. Проворов Н.А., Аронштам А.А. Генетика симбиотической азотфиксации у клубеньковых бактерий // Итоги науки и техники, сер. микробиол. (ВИНИТИ). — 1991. — Т. 23. — С. 3–97.
4. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 12. — С. 1573–1587.
5. Проворов Н.А., Федоров С.Н., Симаров Б.В. Зависимость симбиотической активности клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) от метеорологических факторов // Труды ВНИИСХМ. — 1989. — Т. 59. — С. 45–52.
6. Федоров С.Н., Фокина И.Г., Симаров Б.В. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) в лабораторных условиях // С.-х. биология. — 1986. — № 1. — С. 112–118.
7. Фокина И.Г., Румянцев М.Л., Проворов Н.А. Выявление плазмид, контролирующих симбиотическую активность клубеньковых бактерий клевера // Бюлл. ВНИИСХМ. — 1988. — № 51. — С. 11–16.
8. Чернова Т.А., Аронштам А.А., Симаров Б.В. Изучение генетической природы невирулентных мутантов СХМ1-125 и СХМ1-126 *Rhizobium meliloti* // Генетика. — 1986. — Т. 22, № 8. — С. 2066–2073.

9. *Allen O.N.* Experiments in soil bacteriology. Third edition. Menneapolis, Burgess Publishing Co., 1959. — P. 52–59.
10. *Brom S., Girard L., Garcia-de los Santos A. et al.* Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — Vol. 68, N 5. — P. 2555–2561.
11. *Broughton W.J., Samrey U., Stanley J.* Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: symbiotic plasmid transfer in the *Medicago sativa* rhizosphere // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1987. — Vol. 40. — P. 251–255.
12. *Farrand S.K.* Conjugal plasmids and their transfer // *The Rhizobiaceae* / Eds. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1998. — P. 199–233.
13. *Garcia-de los Santos A., Brom S., Romero D.* *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions // *World J. Microb. Biotech.* — 1996. — Vol. 12. — P. 119–125.
14. *Groisman E.A., Ochman H.* Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps // *Cell.* — 1996. — Vol. 87. — P. 791–794.
15. *Hely F.W.* Symbiotic variation in *Trifolium ambiguum* M. Bieb. with special reference to the nature of resistance // *Austral. J. Biol. Sci.* — 1957. — Vol. 10, N 1. — P. 1–16.
16. *Hely F.W.* Relationship between effective nodulation and time to initial nodulation in a diploid line of *Trifolium ambiguum* M. Bieb. // *Austral. J. Biol. Sci.* — 1963. — Vol. 16, N 1. — P. 43–54.
17. *Jimenez J., Casadesus J.* An altruistic model of *Rhizobium*-legume association // *J. Heredity.* — 1989. — Vol. 80. — P. 335–337.
18. *Laguerre G., Mazurier S.J., Amarger N.* Plasmid profiles and restriction length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* in field populations // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 1992. — Vol. 101. — P. 17–26.
19. *Mercado-Blanco J., Toro N.* Plasmids in rhizobia: the role of non-symbiotic plasmids // *Molec. Plant-Microbe Interact.* — 1996. — Vol. 9, N 7. — P. 535–545.
20. *Olivieri I., Frank S.A.* The evolution of nodulation in *Rhizobium*: altruism in the rhizosphere // *J. Heredity.* — 1994. — Vol. 85. — P. 46–47.
21. *Pretorius-Guth I.M., Puhler A., Simon R.* Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. — Vol. 56. — P. 2354–2359.
22. *Rosenberg C., Hugnet T.* The pAtC58 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* is not essential for tumor induction // *Mol. Gen. Genet.* — 1984. — Vol. 196, N 3. — P. 533–536.
23. *Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez-Romero E.* Genetic structure of a soil population of non-symbiotic *Rhizobium leguminosarum* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1991. — Vol. 57. — P. 426–433.
24. *Simon R., Priefer U., Puhler A.* A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria // *Biotechnology.* — 1983. — Vol. 1, N 11. — P. 784–791.
25. *Wang C.L., Beringer J.E., Hirsch P.R.* Host plant effects on inter-specific hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viceae* and *trifolii* // *J. Gen. Microbiol.* — 1986. — Vol. 132, N 8. — P. 2063–2070.

Transfer of Sym-plasmids into symbiotically active and asymptotic rhizobia strains: properties of recombinants and possible evolutionary consequences

N.A. Provorov, I.G. Fokina, M.L. Roumiantseva, B.V. Simarov
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,
Saint-Petersburg, Pushkin

✿ SUMMARY: Transfer of Sym-plasmids from the clover rhizobia to avirulent mutants of the same rhizobia species or of alfalfa rhizobia resulted in recombinants with a restored symbiotic activity. Transfer of these plasmids into the wild type isogenic strains lead to a decrease of their symbiotic activity. These data confirm the hypothesis on the crucial role of avirulent rhizobia strains in the transfer of Sym-plasmids which directs evolution of these bacteria.

✿ KEY WORDS: nodule bacteria, leguminous plants, host specificity, Sym-plasmids, evolution of symbiosis, N₂-fixing activity, agrobacteria, gene transfer.