

44. Poulsen C. Comments on the structure and function of the large subunit of the enzyme ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. — Carlsberg Res. Commun., 1981, vol. 46, p. 259—278.
45. Rochaix J.-E. Organization, function and expression of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Experientia, 1981, vol. 37, p. 323—332.
46. Rosenberg M., Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. — Ann. Rev. Genet., 1979, vol. 13, p. 319—353.
47. Smith A. G., Gray J. C. Localization of the gene for P700 chlorophyll a protein in pea chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1984, vol. 194, p. 471—476.
48. Spreitzer R. J., Mets L. J. Non-mendelian mutation affecting ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase structure and activity. — Nature, 1980, vol. 285, p. 114—115.
49. Spreitzer R. J., Ogren W. L. Rapid recovery of chloroplast mutations affecting ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, vol. 80, p. 6293—6297.
50. Steinback K. E., McIntosh L., Bogorad L., Arntzen C. J. Identification of the triazine receptor protein as a chloroplast gene product. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, p. 7463—7467.
51. Watson J. C., Surzycki S. J. Extensive sequence homology in the DNA coding for elongation factor Tu from *Escherichia coli* and the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 2264—2267.
52. Westhoff P., Nelson N., Bünemann H. e. a. Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome. — Current Genetics, 1981, vol. 4, p. 109—120.
53. Whitfeld P. R., Bottomley W. Organization and structure of chloroplast genes. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1983, vol. 34, p. 279—310.
54. Willey D. L., Huttly A. K., Phillips A. L. e. a. Localization of the gene for cytochrome f in pea chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1983, vol. 189, p. 85—89.
55. Willey D. L., Aufrett A. D., Gray J. C. Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. — Cell, 1984, vol. 36, p. 555—562.
56. Willey D. L., Howe C. J., Aufrett A. D. e. a. Location and nucleotide sequence of the gene for cytochrome f in wheat chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1984, vol. 194, p. 416—422.
57. Woessner J. P., Masson A., Harris E. H. e. a. Molecular and genetic analysis of the chloroplast ATPase of *Chlamydomonas*. — Plant Molecular Biology, 1984, vol. 3, p. 177—190.
58. Youvan D. C., Marrs B. L. Molecular genetics and the light reactions of photosynthesis. — Cell, 1984, vol. 39, p. 1—3.
59. Zurawski G., Bohnert H. J., Whitfeld P. R. e. a. Nucleotide sequence of the gene for the 32,00—Mr thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of M<sub>r</sub> 38,950. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 7699—7703.
60. Zurawski G., Bottomley W., Whitfeld P. R. Structure of the genes for the β and ε subunits of spinach chloroplast ATPase indicates a dicistronic mRNA and an overlapping translation stop/start signal. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 6260—6264.
61. Zurawski G., Perot B., Bottomley W. e. a. The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. — Nucleic Acids Res., 1981, vol. 9, p. 3251—3270.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

И. Я. ХУДЯКОВ

Цианобактерии (синезеленые водоросли) представляют крайне разнородную группу фотоавтотрофных прокариот, занимающую особое место среди бактерий благодаря способности осуществлять окислительный фотосинтез, во всех основных деталях сходный с таковым у высших растений. Многие виды цианобактерий имеют сложный цикл развития, образуют высокоспециализированные клетки — акиноеты и гетероцисты, а также обладают уникальной способностью к аэробной фотосинтетической фиксации атмосферного азота.

Благодаря этим особенностям цианобактерии являются важными и перспективными объектами биотехнологии и молекулярно-генетических исследований в области фотосинтеза, регуляции клеточной дифференциации и

совместимой с оксигенным фотосинтезом системы фиксации молекулярного азота. В ряде недавних обзоров обобщены сведения, накопленные в результате разностороннего изучения молекулярной биологии цианобактерий [12, 24, 54,]. В последние годы значительные успехи достигнуты в разработке методов генетического анализа и клонирования генов цианобактерий, преодолены методические сложности в получении широкого спектра мутантов [8, 25], для нескольких штаммов одноклеточных цианобактерий показана достаточно высокая частота трансформации как хромосомной, так и плазмидной ДНК [7, 21, 49, 56], у самых различных в систематическом отношении штаммов обнаружены плазмиды и созданы генетически маркированные векторные молекулы, способные реплицироваться как в клетках цианобактерий, так и в *E. coli*. Наконец, были клонированы и подвергнуты детальному структурному анализу некоторые гены цианобактерий.

В этом сообщении суммированы имеющиеся данные о плаزمидях, конструировании векторов и клонировании генов цианобактерий, а также обсуждаются некоторые аспекты использования цианобактерий в качестве объектов генной инженерии.

### ПЛАЗМИДЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ

Кольцевые суперспирализованные молекулы экстрахромосомной ДНК обнаружены у большого числа штаммов как одноклеточных [3, 33, 34, 46, 64], так и нитчатых цианобактерий [30, 42, 53]. Высказывалось немало предположений о том, что плазмиды цианобактерий могут детерминировать такие функции, как фотосинтез и способность к конъюгации [3], устойчивость к ионам тяжелых металлов, синтез токсинов и газовых вакуолей [34, 64], способность фиксировать азот и дифференцировать специализированные клетки [42], однако до настоящего времени все попытки связать те или иные физиологические особенности цианобактерий с присутствием определенного класса плазмид были безуспешными.

Наиболее тщательно плазмидный состав исследован у одноклеточных цианобактерий р. *Synechococcus*. С помощью электрофореза в агарозном геле и электронной микроскопии у *Synechococcus* PCC 7002 было выявлено шесть классов плазмид с молекулярной массой 2,0; 6,5; 10,3; 20,1; 24,7 и 75 МД [46].

Ван ден Холден с соавт. [63, 64] обнаружили плазмиды у 14 из 15 исследованных ими штаммов одноклеточных цианобактерий. Оказалось, что 6 штаммов *Synechococcus* (PCC 6301, 6311, 6707, 6908, 7943 и R-2), отличающиеся по размеру геномов и нуклеотидному составу ДНК содержат плазмиды с одинаковой молекулярной массой — 5,3 и 33 МД. Плазмиды каждого класса из разных штаммов разрезались на одинаковое число фрагментов под действием пяти различных рестриктаз, что говорит о высокой степени их гомологии, если не идентичности, и вероятности существования механизма активного переноса плазмид у этих цианобактерий.

Для штаммов *Synechococcus* PCC 6301 и R-2 была продемонстрирована спонтанная [7, 33] и индуцированная [28] элиминация плазмиды с молекулярной массой 5,3 МД. Поскольку никакой разницы в ростовых характеристиках между «исцеленными» и исходными штаммами обнаружено не было, эта плазида, очевидно, не кодирует никаких жизненно важных (по крайней мере в лабораторных условиях) функций.

Лау с соавт. [34] выявили плазмиды примерно у половины из большого набора исследованных ими штаммов одноклеточных цианобактерий, причем некоторые штаммы содержали до 7—8 различающихся

ся по молекулярным массам плазмид. Гибридизация меченых рестрикционных фрагментов плазмидных ДНК показала, что разные плазмиды одного штамма (а иногда и разных штаммов) содержат сходные по нуклеотидным последовательностям участки, которые, по мнению авторов, могут соответствовать транспозонам и IS-элементам, играющим важную роль в эволюции бактериальных плазмид.

По данным Саймона [53], по крайней мере половина из шестнадцати исследованных им штаммов нитчатых цианобактерий содержит от одной до пяти плазмид разной молекулярной массы. Исследованные штаммы различались по ряду физиологических свойств (способности к азотфиксации, дифференциации специализированных клеток и к гетеротрофному росту), однако никакой корреляции между этими признаками и плазмидным составом автору обнаружить не удалось.

Выделение плазмид из нитчатых цианобактерий связано со значительными методическими сложностями. Из пяти опробованных методов [30], разработанных ранее для быстрого выделения бактериальных плазмид, лишь два позволяют обнаружить при электрофорезе зоны кольцевых суперспирализованных ДНК в препаратах из ряда штаммов цианобактерий, причем число выделяемых при этом плазмид далеко не всегда совпадает. Поэтому данные [30, 53] о количестве плазмид (или их отсутствии) у разных штаммов нитчатых цианобактерий нужно рассматривать как сугубо предварительные.

Интересные результаты были получены при изучении плазмид нитчатой, способной к хроматической адаптации цианобактерии *Calothrix* PCC 7601 (= *Fremyella diplosiphon*). Было обнаружено [5], что этот штамм содержит плазмиды с молекулярной массой от 3,6 до 52 МД, причем наличие или отсутствие некоторых плазмид зависело от применявшегося при выделении детергента. Методом РНК—ДНК гибридизации получены первые свидетельства локализации на трех плаزمидах с мол. массами 10,4; 10,7 и 12,7 МД генов (названных «вердогенами»), транскрипция которых активируется зеленым светом. Данные рестрикционного анализа и гибридизации меченых *Eco*R1-фрагментов этих плазмид выявили наличие в них гомологичных участков.

Плазмидный состав *Calothrix* PCC 7601 исследовался и в других лабораториях [53, 57]. Культура этого штамма была разделена на восемь субкультур и из каждой выделена плазмидная ДНК. Для семи субкультур распределение молекулярных масс плазмид составило 6,1; 10,0; 12,8 и 60 МД, для восьмой — 8,0; 10,0; 11,2 и 13,2 МД [57]. Ни одно из этих распределений не соответствует приведенным выше результатам Богорада с соавт. и Саймона [53], получившего совершенно другие значения молекулярных масс плазмид у этого штамма — 24, 32, 40 и 48 МД. Возможно, столь противоречивые данные свидетельствуют о чрезвычайно высокой способности этих плазмид к перестройке, усиленной присутствием мобильных генетических элементов. В пользу такого предположения говорит особенно высокая ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$ ) частота пигментных мутаций у этого штамма [57].

#### КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ

Несмотря на то, что все известные плазмиды цианобактерий остаются генетически стабильными (т. е. не удается пока обнаружить их фенотипические проявления), применение технологии рекомбинантной ДНК позволило сделать значительные успехи в конструировании гибридных молекул, несущих маркеры устойчивости к антибиотикам и способных реплицироваться как в клетках ряда цианобактерий, так и в *E. coli*.

После трансформации *Synthococcus* 10-2 плазмидой pRI46, несущей  $\beta$ -лактамазный ген *bla*<sub>TEM</sub>, удалось выделить возникающие с очень низкой частотой ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$ ) амки плазмидной ДНК) устойчивые

к ампициллину клоны, содержавшие новую плазмиду с молекулярной массой 8,3 МД, образовавшуюся в результате рекомбинации между эндогенной плазмидой рUH24 (5,3 МД) и Tn 901 [65]. Полученные таким образом рекомбиантные плазмиды рUH24::Tn 901, обозначенные как рUC1-рUC5, содержали встроенную в рUH24 в различных участках полную последовательность Tn 901 и трансформировали *Synechococcus* R-2 с частотой  $10^{-4}$  —  $10^{-5}$ /мкг ДНК. Эти плазмиды, а также их делеционные производные были картированы с помощью ряда эндонуклеаз.

Шерман и ван де Путте [48] трансформировали *Synechococcus* R-2 плазмидой *E. coli* рBR322, в которую предварительно был введен хлорамфеникольный транспозон. Анализ приобретенной устойчивости к ампициллину клонов цианобактерий выявил образовавшиеся *in vivo* гибридные плазмиды, содержавшие ориджини репликации как рUH24, так и рBR322. Одна из этих плазмид с молекулярной массой 6,8 МД, обозначенная рLS103, имеет уникальные сайты узнавания для двух рестриктаз, реплицируется как в *Synechococcus* R-2, так и *E. coli*, сообщает обоим хозяевам устойчивость к ампициллину и может быть амплифицирована в клетках *E. coli* (но не в *Synechococcus* R-2).

Следующим этапом явилось конструирование *in vitro* разнообразных челночных векторов, способных реплицироваться в *E. coli*, оптимизация условий трансформации цианобактерий и выяснение возможности стабильного экстрахромосомного поддержания клонированных генов в гомологичной системе для комплементарного анализа и последующего переноса в *E. coli* для амплификации и структурных и функциональных исследований.

К настоящему времени большой набор векторных молекул получен на основе плазмиды рUH24 *Synechococcus* R-2 (или гомологичных плазмид ряда других штаммов *Synechococcus*) и различных векторов *E. coli* (табл.). Они несут маркеры устойчивости к ампициллину, стрептомицину или хлорамфениколу, могут быть амплифицированы в клетках *E. coli* и содержат единичные сайты рестрикции для целого ряда эндонуклеаз, некоторые из которых находятся внутри генов устойчивости и пригодны для селекции путем вставочной инактивации. Два вектора были сконструированы на основе плазмиды рAQ1 *Synechococcus* PCC 7002, самой маленькой (3,0 МД) из шести плазмид этого штамма [6].

Интересно, что для этих двух штаммов уровень устойчивости к антибиотикам, обусловленный выражением плазмидных генов *E. coli*, особенности процесса трансформации плазмидной ДНК и методы селекции трансформантов существенно различаются. Устойчивость к ампициллину у трансформантов *Synechococcus* R-2 составляет 0,5—1 мкг/мл, а у *Synechococcus* 7002 более 25 мкг/мл. Amp<sup>r</sup>-трансформанты *Synechococcus* 7002 легко селекционируются после 48 ч инкубации в жидкой среде с последующим высевом непосредственно на чашки с высокой концентрацией антибиотика (6). У *Synechococcus* R-2 Amp<sup>r</sup>-трансформанты выявляются только после предварительной инкубации клеток на твердой среде без антибиотика с последующим высевом его под агар: при инкубации в жидкой среде фенотипического выражения устойчивости не происходит.

Насыщающие концентрации плазмидной ДНК при трансформации составляют 30—80 нг/мл для *Synechococcus* R2 [7] и 20 мкг/мл для *Synechococcus* 7002 [6], т. е. различаются в 500 раз. У *Synechococcus* R-2 трансформирующей активностью обладают плазмидные мономеры; димеры рUH24 и векторных молекул вообще не обнаружены. У *Synechococcus* 7002 димеры и тримеры трансформируют в  $10^3$ — $10^4$  раз более эффективно, чем монимерные плазмиды [6].

### Векторные плазмиды цианобактерий

| Вектор       | Размер (кб) | Маркеры                            | Происхождение маркеров | Оригинальная репликация | Единичные сайты рестрикции для (MCS)  | Литература |
|--------------|-------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|---|------------|
| pCH1         | 8,3         | Amp <sup>r</sup>                   | Tn 901                 | pUH24                   | Xho I   | [60]       |
| pUC1         | 5,5         | Amp <sup>r</sup>                   | Tn 901                 | pUH24                   | Xho I, BamIII   | [65]       |
| <b>pUC12</b> | 6,5         | Amp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> | Tn 901, pRI477S        | pUH24                   | Xho I, BamIII   | [28]       |
| pUC13        | 4,6         | Amp <sup>r</sup>                   | pRI477S                | pUH24                   | Bgl I, Xho I  | [28]       |
| pUC14        | 5,2         | <b>Sm<sup>r</sup></b>              | <b>pRI477S</b>         | pUH24                   | Bgl I, Xho I  | [28]       |
| pUC303       | 7,25        | Sm <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>  | pRI477S, pACYC184      | pUH24 + pACYC184        | Eco RI**, Sal I, Xho I<br>Xba I, Sst I  | [28]       |
| pLS103       | 6,8         | Amp <sup>r</sup>                   | pBR322                 | pUH24 + pBR322          | Sal I, Hind III   | [48]       |
| pSG111       | 8,5         | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | pBR328                 | pUH24 + pBR328          | Eco RI**, Xho I, Sal I, Sph I   | [20]       |
| pBAS18       | 8,0         | Amp <sup>r</sup>                   | pBR322                 | pBAI + pBR322           | Eco RI, Xho I   | [51]       |
| pDF30        | 9,3         | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | pBR325                 | pDF3 + pBR325           | Eco RI**, Xho I, Sal I  | [17]       |
| pPLAN B      | 7,1         | Amp <sup>r</sup>                   | pDPL13                 | pANS + pDPL13           | Eco RI, Xba I, Sal I, Sac I, Nar I,<br>Stu I, Sma I                           | [18]       |
| pCB4         | 4,3         | Amp <sup>r</sup>                   | pDPL13                 | pANS + pDPL13           | BamIII, Xba I, Xho I, Nru I, Sma I  | [19]       |
| pECAN1       | 8,9         | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | pBR325                 | pANS + pBR325           | Eco RI**, Sal I   | [19]       |
| pAQE2        | 5,5         | Amp <sup>r</sup>                   | pBR322                 | pAQ1 + pBR322           | Sal I, BamIII, Pvu II   | [6]        |
| pAQE10       | 6,9         | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | pBR325                 | pAQ1 + pBR325           | Eco RI, ** Sal I, BamIII  | [6]        |
| pRUC29*      | 9,1         | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | Tn 901, pACYC184       | pUH24 + pACYC184        | Eco RI**  | [58]       |
| pRL1         | 6,1         | Amp <sup>r</sup>                   | pBR328                 | pDU1 + pBR322           | Bal I, Nco I, Nae I, Nar I, Ban II,<br>Nde I, Cla I, Bcl I, Bgl I             | [69]       |
| pRL8         | 7,6         | Ery <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> | pE194, pBR328          | pDU1 + pBR322           | Bal I, ** Nco I, ** Nae I, Nar I, **<br>Ava II, ** Sst I, Cla I, Bcl I, Bgl I | [69]       |

\* Космидный вектор.

\*\* Сайт для селекции путем вставочной инактивации маркера.

Присутствие большого числа различных плазмид, образование мультимерных форм и особенности трансформации затрудняют использование *Synechococcus* 7002 в экспериментах по молекулярному клонированию. Кроме того, этот штамм содержит эндонуклеазу *Aqu* 1 — изошизомер *Ava* I, и присутствие лишь одного сайта для этой рестриктазы на два порядка снижает эффективность трансформации [6]. Помимо рестрикционного барьера, ценность векторов, основанных на *pAQ1*, снижается также тем фактом, что они могут реплицироваться в *Synechococcus* 7002 только в присутствии эндогенных *pAQ1* и быстро элиминируются в неселектирующих условиях.

В *Synechococcus* R-2 векторные плазмиды также легко теряют неселектируемые маркеры в том случае, если вектор имеет два района, гомологичных эндогенной плазмиде, разделенных двумя негомологичными районами. Нестабильность, очевидно, объясняется рекомбинацией между *pUH24* и двумя гомологичными районами вектора, что ведет к выщеплению и элиминации (либо рекомбинации с гомологичными хромосомными участками) гетерологичных для плазмиды вставок [20, 28].

С учетом этого факта была сконструирована гибридная плаزمида *pSG111*, которая сохраняет структурную и генетическую стабильность после пассажей через *Synechococcus* R-2 и *E. coli* [20]. Другой путь стабилизации векторов заключается в использовании штаммов цианобактерии, из которых была удалена эндогенная плазмиды *pUH24* [7, 28].

До настоящего времени все попытки осуществить трансформацию нитчатых азотфиксирующих цианобактерий как хромосомной, так и плазмидной ДНК были безуспешными [31, 41, 68]. Несмотря на это, удалось все же [69] сконструировать челночные векторы, реплицирующиеся в ряде штаммов азотфиксирующих цианобактерий р. *Anabaena* и в *E. coli*. Для введения их в клетки цианобактерий была использована способность конъюгативной плазмиды *RP4* осуществлять перенос производных *pBR 322* из *E. coli* в другие Грам-отрицательные бактерии. Такой перенос возможен при наличии участка *bom* (*basis of mobility*) на переносимой плазмиде и действующих в транс-положении дополнительных факторов, обеспечиваемых плазмидами *pDS 4101* (*Colk* : : *Tn* I) или *pGJ28* (*ColD Km'*) [15, 59].

Вначале плазмиды *pDU1* из *Nostoc* PCC 7524 [43] после частичного расщепления *Eco* RV была встроена в *Eco* RV сайт *pBR322*, и полученная в результате гибридная плазмиды *pVW1* послужила основой для конструирования серии челночных векторов, из которых были удалены присутствующие в *pBR322* сайты для *Ava* I и *Ava* II — рестриктаз, содержащихся в большинстве штаммов *Anabaena* [14], и введены маркеры устойчивости к антибиотикам, пригодным для селекции переносимых в *Anabaena* плазмид. Некоторые характеристики этих векторов приведены в таблице.

Как отмечается, успешное конструирование векторов обусловлено способностью гибридных плазмид с репликоном из *Nostoc* реплицироваться в филогенетически близких цианобактериях р. *Anabaena*. В то же время сконструированные векторы не удается ввести в клетки *Synechococcus* R-2, хотя конъюгативный перенос из *E. coli* в эту одноклеточную цианобактерию возможен для мобилизуемого производного вектора *pSG111*, содержащего репликон из *Synechococcus*.

#### КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ

Конструирование векторных молекул открывает широкие возможности для клонирования генов цианобактерий и изучения их выражения в гомологичной и гетерологичной системах. До сих пор, однако,

значительные успехи были достигнуты в клонировании цианобактериальных генов только в *E. coli*.

Группой М. Сувары были клонированы гены рибосомальных рРНК [61] и обеих субъединиц рибулезобисфосфаткарбоксилазы (РБФК) [50, 52] — ключевого фермента автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  в цикле Кальвина — Бассема. Гены рРНК *Synechococcus* 6301 были локализованы гибридизацией с мечеными рРНК на двух Pst I-фрагментах (6,5 и 8,0 тыс. п. н.) хромосомной ДНК, клонированы в рBR322 и охарактеризованы методами рестрикционного картирования и ДНК-РНК гибридизации [61]. Организация двух кластеров генов рРНК оказалась сходной, небольшие различия в рестрикционных сайтах наблюдаются преимущественно в некодирующих участках. Оба кластера содержат последовательность 16S-ген(ы) рРНК—23S—5S рРНК и в этом отношении ближе таковым *E. coli* и хлоропластов *Euglena*, чем более сложно организованным генам рРНК хлоропластов *Chlamydomonas* и высших растений [35, 66]. Для гена 16S рРНК была определена полная нуклеотидная последовательность [60]. По длине (1487 п. н.) он почти идентичен генам хлоропластных рРНК и на 4% короче, чем у *E. coli*. По степени гомологии нуклеотидных последовательностей он также ближе аналогичному гену хлоропластов табака (83%), чем *E. coli* (74%). Более того, вероятная вторичная структура (организация стебельков и петель) 16S рРНК *Synechococcus* гораздо ближе таковой хлоропластных рРНК, чем 16S рРНК *E. coli*, что является еще одним аргументом в пользу эндосимбиотической теории происхождения хлоропластов.

Клонированные гены большой (БС) и малой субъединиц (МС) РБФК *Synechococcus* 6301 также были секвенированы [51, 53]. Вычисленные аминокислотные последовательности БС и МС гомологичны, соответственно на 80 и 40%, аминокислотным последовательностям аналогичных субъединиц РБФК высших растений, однако гомология в нуклеотидных последовательностях генов БС *Synechococcus* и высших растений составляет лишь 70% из-за значительных различий в частоте использования разных кодонов. В отличие от зеленых водорослей и высших растений, у которых гены БС и МС разобщены и локализуются соответственно в хлоропластном и ядерном геномах, на хромосоме *Synechococcus* 6301 эти гены расположены рядом, и, поскольку в разделяющем их спайсерном районе (93 п. н.) отсутствуют сходные с промоторными последовательности, они, очевидно, транскрибируются совместно. Интересно, что у красных водорослей, пластиды (родопластида) которых по пигментному составу сходны с цианобактериями, обе субъединицы РБФК кодируются пластидным геномом [55].

Группой Р. Халезкорна, исследующей регуляцию дифференциации гетероцист и организацию генов фиксации азота у *Anabaena* 7120, были клонированы три класса генов, имеющих особое значение для азотфиксации: *nif* I-ген, кодирующий структурные компоненты нитрогеназы [11], ген *nif* A, кодирующий фермент глутаминсинтетазу [16], и ген *gln* A, кодирующий большую субъединицу РБФК [9]. В настоящее время *Anabaena* 7120 является единственным организмом, у которого нуклеотидные последовательности генов *nif* I [12], *nif* A [13] и *gln* A [14], кодирующих соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы нитрогеназы, и *nif* H, кодирующего редуктазу нитрогеназы [38]. Физическое картирование клонированных фрагментов ДНК, содержащих эти гены, выявило их транскрипции *in vivo* выявили несколько неожиданные особенности в организации *nif* генов *Anabaena* [23, 62]. У *Nitrosella* — классического объекта, на котором были обнаружены гены *nif* H, *nif* D и *nif* E, кодирующие структурные гены фиксации азота, — структурные гены *nif* H, *nif* D и

пиф К расположены рядом и транскрибируются совместно [45]. У *Anabaena* сцеплены и совместно транскрибируются лишь пиф Н и пиф D, а ген пиф К отделен от пиф Н--D участком длиной 11 тыс. п. н., большая часть которого, очевидно, не содержит генов, непосредственно связанных с азотфиксацией. Поскольку  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы нитрогеназы должны синтезироваться в одинаковом количестве, необходима строгая координация транскрипции и трансляции генов пиф D и пиф К. Видимо, это достигается за счет гомологии промоторных участков и участков связывания рибосом, предшествующих этим генам [36].

Интересно, что промоторные последовательности генов пиф К *Anabaena* и гбс А хлоропластов шпината и кукурузы практически идентичны. Поскольку РБФК является основным растворимым белком в листьях растений, пиф гены *Anabaena* могли бы эффективно транскрибироваться в хлоропластах [37]. В то же время промоторы пиф-генов *Anabaena* отличаются от сильных бактериальных промоторов [23]; скорее они соответствуют очень сильным «down»-мутациям в промоторах фагов *E. coli*, слабо транскрибируются *in vitro* РНК-полимеразами *Anabaena* и *E. coli* и для транскрипции *in vivo* должны активироваться, вероятно, аналогом продукта гена пиф А *Klebsiella*.

Клонированные пиф-гены *Anabaena* были использованы в качестве проб для исследования организации пиф-генов у двух других азотфиксирующих цианобактерий — одноклеточной *Gloeotheca* sp. 6909 и нитчатой, образующей гетероцисты *Calothrix* sp. 7601 [26]. Оказалось, что у *Calothrix*, подобно *Anabaena*, гены пиф D и пиф Н сцеплены, а пиф К локализуется на других рестриктазных фрагментах ДНК. У *Klebsiella* все пиф-гены сгруппированы на отрезке ДНК длиной около 20 тыс. п. н.; у *Anabaena* клонированные пиф-гены расположены на непрерывном участке ДНК длиной 40 тыс. п. н., однако после индукции азотфиксации лишь 15 тыс. п. н. этого участка транскрибируются, и, вероятно, по крайней мере часть остальных пиф-генов расположена в других районах хромосомы [23]. Напротив, у одноклеточной *Gloeotheca* гены пиф К, D и Н сцеплены, и их порядок соответствует таковому у *Klebsiella*. Поскольку *Gloeotheca* не дифференцирует гетероцист, обеспечивающих необходимые для функционирования нитрогеназы анаэробные условия, а структурные гены ее нитрогеназы гомологичны генам *Anabaena* и *Klebsiella*, эта цианобактерия должна обладать принципиально иными механизмами защиты нитрогеназы от кислорода [26].

Клонированные гены gln А и гбс А *Anabaena* были использованы в качестве проб для исследования регуляции транскрипции в процессе индукции дифференциации гетероцист и азотфиксации [23, 62]; gln А является пока единственным геном цианобактерий, выражение которого в гетерологичной системе было продемонстрировано комплексной делеционной системой gln А мутанта *E. coli* и иммунологической идентичностью синтезируемого в этом мутанте и очищенного из *Anabaena* фермента [16].

Для того чтобы обойти необходимость в гетерологичных пробах для идентификации и клонирования генов цианобактерий, был разработан метод, основанный на использовании транспозона для индукции мутаций и их физического маркирования [58]. Подобный подход позволяет осуществлять анализ функциональной организации генов цианобактерий, если нет методов прямой селекции и гетерологичных проб ДНК.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За пять лет, прошедших после первых сообщений о создании гибридных плазмид [65] и клонировании генов [36, 38] цианобактерий, были разработаны разнообразные челночные векторные молекулы, при-



годные для исследования фотосинтеза, клеточной дифференциации, фиксации азота и других аспектов физиологии цианобактерий современными методами молекулярной генетики, и получены первые данные об организации их генома, имеющие принципиальное значение для развития наших представлений о филогении и эволюции про- и эукариот [13].

Очевидно, в будущем цианобактерии могут быть использованы как экономически выгодные источники биологически активных веществ. Для этих целей необходима разработка методов клонирования генов, их амплификации и эффективного выражения в гомологичной системе. Все сконструированные до настоящего времени векторы цианобактерий для этого не пригодны. Одна из не исследованных пока возможностей — использование вирусов цианобактерий — цианофагов.

Свойства цианофагов и особенности их взаимодействия с клетками были описаны в ряде обзоров [22, 39, 47]. Особый интерес представляет умеренный цианофаг A-4L [2], способный лизировать и лизогенизировать азотфиксирующие штаммы *Anabaena* sp. PCC 7120 и *A. variabilis* ATCC 29413, являющиеся в настоящее время основными модельными объектами в исследованиях по физиологии, биохимии и генетике азотфиксации и регуляции клеточной дифференциации у цианобактерий. С помощью цианофага A-4L была выявлена эффективная система рестрикции и модификации ДНК у штаммов *Anabaena*, а также получен термондуцибельный мутант этого фага [1]. Потенциальные возможности использования A-4L в качестве вектора включают встраивание клонируемых фрагментов ДНК в геном профага, где они могут стабильно поддерживаться и амплифицироваться после термондукции; использование фаговых промоторов для эффективной транскрипции клонированных генов; встраивание *in vitro* больших фрагментов чужеродной ДНК в фаговый геном с последующей трансформацией лизогенных штаммов, что может позволить введение чужеродных генов в геном профага и их стабильное наследование. Для этих целей необходимы физическое и генетическое картирование ДНК A-4L, выделение жизнеспособных делеционных мутантов и разработка системы трансфекции клеток *Anabaena* фаговой ДНК.

Нельзя не упомянуть сообщения об успешной разработке методов введения чужеродной ДНК в хромосому *Synechococcus* R-2 [27, 67]. Эти работы открывают перспективу использования фотоавтотрофных цианобактерий в самых различных биотехнологических проектах.

Помимо клонирования генов цианобактерий, векторные плазмиды начинают использоваться для клонирования в клетках цианобактерий хлоропластных генов (см. 18).

Как имеющиеся данные указывают на то, что даже обладающие относительно широким кругом хозяев (включающим и аноксигенные цианобактерии) бактериальные плазмиды не способны реплицироваться в цианобактериях [10, 19, 41]. Возможно, это свидетельствует о существовании каких-то принципиальных различий в механизмах репликации ДНК у цианобактерий и других прокариот. В связи с этим особый интерес представляет поиск плазмид, способных реплицироваться в физиологически отдаленных цианобактериях, и исследование возможности их репликации в хлоропластах эукариот с целью разработки векторов, пригодных для введения генетической информации в хлоропластный геном. Перспективы использования хлоропластов в качестве мишеней уже обсуждались в литературе [4, 40]. Одной из наиболее заманчивых перспектив является введение в них генов азотфиксирующих цианобактерий, которые выработали защитные механизмы, позволяющие высокочувствительной к кислороду нитрогеназе функционировать в клетках, осуществляющих оксигенный фотосинтез.

## Summary

Cyanobacteria (blue-green algae) are important and perspective objects of biotechnology and molecular genetic studies of photosynthesis, regulation of cellular differentiation and nitrogen fixing system compatible with oxygenic photosynthesis. Plasmids were found in various strains of cyanobacteria belonging to different systematic groups, but all attempts to detect their phenotypic manifestation failed. Application of recombinant DNA technology permitted the construction of a variety of hybrid vector molecules capable of replication in some unicellular or filamentous nitrogen-fixing strains and in *E. coli* and suitable for investigations of different aspects of cyanobacterial physiology by modern molecular genetic methods. Cloning of genes for ribosomal RNAs, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, glutamine synthetase and structural subunits of dinitrogenase made it possible to obtain the initial information about the organization of cyanobacterial genome which is of basic importance for our ideas in phylogeny and evolution of pro- and eukaryotes.

## УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Худяков И. Я. Особенности развития умеренного цианофага А-4L в трех штаммах цианобактерий р. Анабаена. Тез. докл. конф. «Вирусы микроорганизмов». Пушкино, 1981, с. 106—107.
2. Худяков И. Я., Громов Б. В. Умеренный цианофаг синезеленой водоросли *Anabaena variabilis*. — Микробиология, 1973, т. 42, с. 904—907.
3. Asato Y., Ginosa H. S. Separation of small circular DNA molecules from the blue-green alga *Anacystis nidulans*. — Nature, 1973, vol. 244, p. 132—133.
4. Bogorad L. The chloroplast, its genome and possibilities for genetically manipulating plants. — In: Genetic engineering. Principles and methods. Plenum Press, 1979, vol. 1, p. 181—203.
5. Bogorad L., Gendel S. M., Haury J. H., Koller K.-P. Photomorphogenesis and complementary chromatic adaptation in *Fremyella diplosiphon*. — In: Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function. Amsterdam, 1983, p. 119—126.
6. Buzby J. S., Porter R. D., Stevens S. E. Plasmid transformation in *Agmenellum quadruplicatum* PR-6: construction of biphasic plasmids and characterization of their transformation properties. — J. Bacteriol., 1983, vol. 154, p. 1446—1450.
7. Chauvat F., Astier C., Vedel F., Joset-Espardellier F. Transformation in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2: improvement of efficiency; role of the pUH24 plasmid. — Molec. Gen. Genet., 1983, vol. 191, p. 39—45.
8. Currier T. C., Haury J. F., Wolk C. P. Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous cyanobacterium. — J. Bacteriol., 1977, vol. 129, p. 1556—1562.
9. Curtis S. E., Haselkorn R. Isolation and sequence of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, vol. 80, p. 1835—1839.
10. Delaney S. F., Reichelt B. Y. Integration of the R plasmid, R 68.45, into the genome of *Synechococcus* PCC 6301. Abstr. IVth Int. Symp. Photosynth. Prokar., Paris, 1982, D 5.
11. Devilly C. I., Houghton J. A. A study of genetic transformation in *Gloeocapsa alpicola*. — J. Gen. Microbiol., 1977, vol. 98, p. 277—280.
12. Doolittle W. F. The cyanobacterial genome, its expression, and the control of that expression. — Adv. Microb. Physiol., 1979, vol. 20, p. 1—102.
13. Doolittle W. F. Molecular evolution. — In: The Biology of Cyanobacteria. — Botanical Monographs, 1982, vol. 19, p. 307—331.
14. Duyvesteyn M. G. C., Korsuize J., de Waard A., Vonshak A., Wolk C. P. Sequence-specific endonucleases in strains of *Anabaena* and *Nostoc*. Arch. Microbiol., 1983, vol. 134, p. 276—281.
15. Finnegan J., Sherratt D. Plasmid Col E1 conjugal mobility: the nature of bom, a region required in cis for transfer. — Molec. Gen. Genet., 1982, vol. 185, p. 344—351.
16. Fisher R., Tuli R., Haselkorn R. A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylated. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, p. 3393—3397.
17. Friedberg D., Seiffers J. A new hybrid plasmid capable of transforming *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*. — Gene, 1983, vol. 22, p. 267—275.
18. Gendel S., Straus N., Pulleybank D., Williams J. A novel shuttle cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. — FEMS Microbiol. Lett., 1983, vol. 19, p. 291—295.
19. Gendel S., Straus N., Pulleybank D., Williams J. Shuttle cloning vectors for the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. — J. Bacteriol., 1983, vol. 156, p. 148—154.
20. Golden S. S., Sherman L. A. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. — J. Bacteriol., 1983, vol. 155, p. 966—972.
21. Grigorieva G., Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. — FEMS Microbiol. Lett., 1982, vol. 13, p. 367—370.
22. Gromov B. V. Cyanophages. — Ann. Microbiol., 1983, vol. 134B, p. 43—59.

23. Haselkorn R., Rice D., Curtis E., Robinson S. J. Organization and transcription of genes important in *Anabaena* heterocyst differentiation. — *Ann. Microbiol.*, 1983, vol. 134B, p. 181—194.
24. Herdman M. Evolution and genetic properties of the genome. — In: *The Biology of Cyanobacteria*. Botanical Monographs, vol. 19, p. 263—305.
25. Herdman M., Delaney S. F., Carr N. G. Mutation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* (*Synechococcus* PCC 6301): improved conditions for the isolation of auxotrophs. — *Arch. Microbiol.*, 1980, vol. 124, p. 177—184.
26. Kallas T., Rebiere M.-C., Rippka R., Tandeau de Marsac N. The structural *nif* genes of the cyanobacteria *Gloeotheca* sp. and *Calothrix* sp. share homology with those of *Anabaena* sp., but the *Gloeotheca* genes have a different arrangement. — *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 155, p. 427—431.
27. Kolowsky K. S., Williams J. G. K., Szalay A. A. Length of foreign DNA in chimeric plasmids determines the efficiency of its integration into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R-2. — *Gene*, 1984, vol. 27, p. 289—299.
28. Kahlemeier C. J., Thomas A. A. M., Van der Ende A., Van Leen R. W., Borrias W. E., Van den Hondel C. A. M. J. J., Van Arkel G. A. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R-2. — *Plasmid*, 1983, vol. 10, p. 156—163.
29. Kumano M., Tomioka N., Sugiuro M. The complete nucleotide sequence of a 23S rRNA from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. — *Gene*, 1983, vol. 24, p. 219—225.
30. Lambert G. R., Carr N. G. Rapid small-scale plasmid isolation by several methods from filamentous cyanobacteria. — *Arch. Microbiol.*, 1982, vol. 133, p. 122—125.
31. Lambert G. R., Carr N. G. Plasmids in filamentous cyanobacteria. — In: *Abstr. IV Int. Symp. Photosynth. Prokar.* Paris, 1982, D3.
32. Lammers P. J., Haselkorn R. Sequence of the *nif* D gene coding for the  $\alpha$ -subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 4723—4727.
33. Lau R. H., Doolittle W. F. Covalently closed circular DNA in closely related unicellular cyanobacteria. — *J. Bacteriol.*, 1979, vol. 137, p. 648—652.
34. Lau R. H., Sapienza C., Doolittle W. F. Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence, and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species. — *Molec. Gen. Genet.*, 1980, vol. 178, p. 203—211.
35. Loiseaux S., Dalmon J. Some characteristics of plastid DNA from different algae. — *Physiol. Veg.*, 1983, vol. 21, p. 775—784.
36. Mazur B. J., Chiu C.-F. Sequence of the gene coding for the  $\beta$ -subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 6782—6786.
37. Mazur B. J., Rice D., Haselkorn R. Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 186—190.
38. Mevarech M., Rice D., Haselkorn R. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nif* H gene coding for nitrogenase reductase. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 6476—6480.
39. Padan L., Shilo M. Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. — *Bacteriol. Revs.*, 1973, vol. 37, p. 343—370.
40. Postgate J. R., Cannon F. C. The molecular and genetic manipulation of nitrogen fixation. — *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1981, vol. B292, p. 589—599.
41. Reuston J., Duwvesteyn M. G. C., de Waard A. *Nostoc* PCC 7524, a cyanobacterium which contains five sequence-specific deoxyribonucleases. — *Gene*, 1982, vol. 20, p. 103—110.
42. Reuston J., Van den Hondel C. A. M. J. J., Van der Ende A., Herdman M., Van Arkel G. A., Stewart W. D. P. Comparison of plasmids from the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524 with two mutant strains unable to form heterocysts. — *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980, vol. 9, p. 185—188.
43. Reuston J., Van den Hondel C. A. M. J. J., Van Arkel G. A., Stewart W. D. P. A physical map of plasmid pDUI from the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524. — *Plasmid*, 1982, vol. 7, p. 101—104.
44. Rice D., Mazur B. J., Haselkorn R. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 13157—13163.
45. Roberts G. P., Brill W. J. Genetics and regulation of nitrogen fixation. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1981, vol. 35, p. 207—235.
46. Roberts T. M., Koths K. E. The blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum* contains covalently closed DNA circles. — *Cell*, 1976, vol. 9, p. 551—557.
47. Sherman L. A., Brown R. M. Algal viruses. — *Compreh. Virol.*, 1978, vol. 12, p. 145—234.
48. Sherman L. A., Van de Putte P. Construction of a hybrid plasmid capable of replication in the bacterium *Escherichia coli* and the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. — *J. Bacteriol.*, 1982, vol. 150, p. 410—413.

49. *Shestakov S. V., Khyen N. T.* Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1970, vol. 107, p. 372—375.
50. *Shinozaki K., Sugiura M.* The gene for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is located close to the gene for the large subunit in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. — *Nucleic Acids Res.*, 1983, vol. 11, p. 6957—6964.
51. *Shinozaki K., Tomioka N., Yamada C., Sugiura M.* Cloning and characterization of a plasmid DNA from *Anacystis nidulans* 6301. — *Gene*, 1982, vol. 19, p. 221—224.
52. *Shinozaki K., Yamada C., Takahata N., Sugiura M.* Molecular cloning and sequence analysis of the cyanobacterial gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 4050—4054.
53. *Simon R. D.* Survey of extrachromosomal DNA found in the filamentous cyanobacteria. — *J. Bacteriol.*, 1978, vol. 136, p. 414—418.
54. *Stanier R. Y., Cohen-Bazire G.* Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1977, vol. 31, p. 225—274.
55. *Steinmüller K., Kaling M., Zetsche K.* In vitro synthesis of phycobiliproteids and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by non-poly-adenylated-RNA of *Cyanidium caldarium* and *Porphyridium aeruginosum*. — *Planta*, 1983, vol. 159, p. 308—313.
56. *Stevens S. E., Porter R. D.* Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 6052—6056.
57. *Tandeau de Marsac N.* Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. — *Bull. Inst. Pasteur*, 1983, vol. 81, p. 201—254.
58. *Tandeau de Marsac N., Borrius W. E., Kuhlemeier C. J., Castets A. M., Van Arkel G. A., Van den Hondel C. A. M. J. J.* A new approach for molecular cloning in cyanobacteria: cloning of an *Anacystis nidulans* met gene using a Tn 901-induced mutant. — *Gene*, 1982, vol. 20, p. 111—119.
59. *Taylor D. P., Cohen S. N., Clark W. G., Marrs B. L.* Alignment of genetic and restriction maps of the photosynthesis region of the *Rhodospseudomonas capsulata* chromosome by a conjugation-mediated marker rescue technique. — *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, p. 580—590.
60. *Tomioka N., Sugiura M.* The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1983, vol. 191, p. 46—50.
61. *Tomioka N., Shinozaki K., Sugiura M.* Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1981, vol. 184, p. 359—363.
62. *Tumer N. E., Robinson S. J., Haselkorn R.* Different promoters for *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. — *Nature*, 1983, vol. 306, p. 337—342.
63. *Van den Hondel C. A. M. J. J., Van Arkel G.* Development of a cloning system in cyanobacteria. — *Antonie van Leeuwenhoek*, 1980, vol. 46, p. 228—229.
64. *Van den Hondel C. A. M. J. J., Keegstra W., Borrius W. E., Van Arkel C. A.* Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria. — *Plasmid*, 1979, vol. 2, p. 323—333.
65. *Van den Hondel C. A. M. J. J., Verbeek S., Van der Ende A., Weisbeek P. J., Borrius W. E., Van Arkel G.* Introduction of transposon Tn 901 into a plasmid of *Anacystis nidulans*: preparation for cloning in cyanobacteria. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 77, p. 1570—1574.
66. *Wallace D. C.* Structure and evolution of organelle genomes. — *Microbiol. Revs.*, 1982, vol. 46, p. 208—240.
67. *Williams J. G. K., Szalay A. A.* Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R-2. — *Gene*, 1983, vol. 24, p. 37—51.
68. *Wolk C. P., Kraus J.* Two approaches to obtaining low, extracellular deoxyribonuclease activity in cultures of heterocyst-forming cyanobacteria. — *Arch. Microbiol.*, 1982, vol. 131, p. 302—307.
69. *Wolk C. P., Vonshak A., Kehoe P., Elhai J.* Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, p. 1561—1565.