

Rhizobium meliloti szimbiotikus mutánsok
előállítására és jellemzése

Írta: Forrai Tamás

Doktori disszertáció

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központja
Genetikai Intézet

S Z E G E D

1 9 8 8.



TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1
II.	CÉLKITŰZÉS	3
III.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	
	1. A Rhizobium genetikai rendszer létrehozása	4
	2. Genetikai térképezés Rhizobiumban	5
	3. Szimbiotikus mutánsok Rhizobiumban	7
	4. A szimbiotikus kapcsolat morfológiai vonatkozásai	8
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
	1. Baktérium törzsek és plazmidok	12
	2. Táptalajok és hígítók	12
	3. Mutagenézis	12
	3.1. NTG mutagenézis	12
	3.2. Tn5 mutagenézis	13
	4. Genetikai térképezés, konjugáció	13
	5. Növényi teszt	14
	6. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok	15
	6.1. Preinfekciós jelenségek vizsgálata	16
	6.2. A gümőszerkezet vizsgálata	16
	7. A disszertációban alkalmazott rövidítések	17

V.	EREDMÉNYEK	
1.	Szimbiózisban hibás mutánsok előállítása	21
2.	A Nod ⁻ és Fix ⁻ mutációk genetikai analízise	24
2.1.	NTG indukált mutánsok térképezése	25
2.2.	Tn5 transzpozícióval előállított mutánsok térképezése	28
3.	A gümőfejlődés vizsgálata Rhizobium meliloti 41- -Medicago sativa szimbiózis kialakulásakor	31
3.1.	A vad típusú gümő szerkezete	31
3.2.	A szimbiózisban hibás mutánsok mikroszkópos jellemzése	42
VI.	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	
1.	Mutagenézis	45
2.	A mutánsok genetikai analízise	47
3.	A gümőfejlődés lépéseinek vizsgálata	48
4.	Gümőszerkezeti vizsgálatok	48
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	51
VIII.	FELHASZNÁLT IRODALOM	52

A doktori disszertációm a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készítettem.

Köszönetet mondok **Alföldi Lajos** főigazgatónak, hogy más elfoglaltságom ellenére is lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom **Dr. Kondorosi Ádám**nak - munkacsoportunk vezetőjének - aki figyelmemet a szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálata felé fordította és munkámat kritikájával segítette.

A tényleges kísérleti munka és eredmények nem születhettek volna meg **Dr. Vincze Évával** és **Dr. Kiss György Botonddal** folytatott napi diszkussziók és közös kísérletek nélkül.

Köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott technikai segítséget **Bíró Magdolnának** és **Kissné Tóth Tündének**.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak - munkacsoportunk tagjainak - akik nemcsak tanácsaikkal és kritikájukkal segítették munkámat, hanem munkám az Ő eredményeikre épül.

A fény- és elektronmikroszkópos munkáknál nyújtott segítségükért **Joó Ferencnek** és munkacsoportjának, az ábrák és fényképek elkészítéséért **Dusha Bélának** és **Mitrov Etelkának** mondok köszönetet.

Külön köszönöm szüleimnek, hogy szűkös lehetőségeik ellenére vállalták egyetemi tanulmányaim fedezését, valamint feleségemnek, hogy mindig biztosította számomra a zavartalan munkavégzés lehetőségét.

Szeged, 1988 február 29.

I. BEVEZETÉS

A törzsfejlődés folyamán több olyan jelentős állomást tartunk számon, mely alapvetően befolyásolta a fejlődés további irányát. Ezek közül is kiemelkedik két olyan folyamat, mely a továbbiakban meghatározó jelentőségűvé vált.

1. A légköri oxigént produkáló **fotoszintézis**,
2. és az inert légköri nitrogén gázt ammóniává redukáló **biológiai nitrogénkötés**

megjelenése.

Közismert, hogy a mezőgazdaságban a növények táplálásához felhasznált nitrogén mennyisége egyre növekszik és az ipari nitrogénfixálás egyre költségesebb. Így nem meglepő, hogy a figyelem egyre inkább a biológiai nitrogénkötés lehetőségeinek fokozása felé fordul.

A légköri nitrogén (az oxigénhez hasonlóan) egy körfolyamaton keresztül válik az élő szervezetek számára hozzáférhetővé, mely körfolyamat egyik "bemenő ágán", a baktériumok és növények közötti szimbiotikus kapcsolat eredményeképpen képződik szerves nitrogén. Mint azt a korábbi évek vizsgálatai bizonyították, az összes élő szervezetben fellelhető kötött nitrogén ebből a forrásból származik leszámítva az újkori ipari szintéziseket (pl. Haber-Bosch eljárás). Bár ez utóbbi nagyságrendekkel kevesebb kötött

nitrogént eredményez mint a biológiai nitrogénkötés, gyakorlati szempontból (pl. műtrágya gyártás) mégis nagy jelentőségű.

A szimbiotikus kapcsolat során a légköri nitrogén megkötésére specializálódott szerv - gyökérgümő - alakul ki. A gyökérgümő fejlődésének és működésének szabályozásában mind bakteriális, mind növényi gének és géntermékek résztvesznek.

A legjobban ismert szimbiotikus nitrogénkötő kapcsolatok a **Rhizobiaceae** család baktériumai és a **Leguminosae** család növényei között alakultak ki. A szimbiotikus nitrogénkötés folyamatának egyes lépései (ld. 1. Táblázat) a Szója - *Rhizobium japonicum*, *Trifolium* - *Rhizobium trifolii* rendszerekben a legismertebbek, de egyre több információt kapunk a Bab - *Rhizobium phaseoli*, Borsó - *Rhizobium leguminosarum* valamint a **Lucerna - *Rhizobium meliloti*** rendszerekről is.

Bár a szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálata ma már molekuláris biológiai szinten folyik, ez nem jelenti azt, hogy mindent tudunk a folyamat fiziológiájáról, biokémiájáról, genetikájáról vagy struktúrális vonatkozásairól. Az ilyen irányú vizsgálatok elméleti jelentőségükön túl (probléma felvetés a molekuláris biológiai megközelítési mód számára), a gyakorlatban hasznosítható eredményekre is vezethetnek, mely minden tudományos tevékenység közeli vagy távoli célja kell, hogy legyen.

II. CÉLKITŰZÉS

Munkacsoportunk a biológiai nitrogénkötés folyamatát a

Lucerna - Rhizobium meliloti 41

szimbiózisos rendszerben vizsgálja.

Jelen doktori disszertációmban azokról a közös célkitűzéshez kapcsolódó kísérletekről számolok be, melyek a genetikai és struktúrális megközelítési mód segítségével szolgáltatnak adatokat a biológiai nitrogénkötés jobb megértéséhez.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szimbiotikus nitrogénkötés intenzív kutatása mintegy tizenöt évvel ezelőtt indult meg. A kezdeti vizsgálatok jórészt taxonómiai, fiziológiai összefüggéseket tártak fel (Keele és mtsi, 1969; Martinez-De Drets és Arias 1972; Ucker és Signer, 1978). Jelentős előrelépést a modern genetikai - biokémiai (molekuláris biológiai) szemléletmód bevezetése hozott.

1. A Rhizobium genetikai rendszer létrehozása.

A szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálatának alapvető feltétele a résztvevő bakteriális partner genetikai rendszerének megteremtése volt. Az erre irányuló kísérleti munka előfeltétele egy jól jellemzett **mutánsparc** elkészítése (Kondorosi és mtsi, 1973; Ruvkun és Ausubel, 1981) valamint olyan **genetikai információátviteli rendszerek** kidolgozása, melyek gramm negatív baktériumokban is hatásosak (Kondorosi és mtsi, 1973; Haas és Holloway, 1976; Holloway, 1979; Julliot és Boistard, 1979; Brewin és mtsi, 1980; Kiss és mtsi, 1980; Vincze és mtsi, 1981).

A **konjugációs** kromoszóma átvittel párhuzamosan kidolgoztak más információátviteli rendszereket is, így a Rhizobiumok **transzdukcióját** (Sváb és mtsi, 1978; Sík és Horváth, 1980) és **transzformációját** (Gábor-Hotchkiss, 1972; Dunican és Tierney, 1973; Kiss és Kálmán, 1982).



Közel egyidőben 4 Rhizobium faj - Rhizobium meliloti 2011 (Meade és Signer, 1977) Rhizobium meliloti 41 (Kondorosi és mtsi, 1977/b) Rhizobium leguminosarum 300 (Beringer és mtsi 1978/a) Rhizobium meliloti GR4 (Casadeus és Olivares, 1979) - konjugációs genetikai térképét alkották meg.

2. Genetikai térképezés Rhizobiumban

Egy organizmus **genetikai térképének** megalkotását, a vizsgált tulajdonságok együttes öröklődésének mérése teszi lehetővé. Két gén térképhelye annál közelebb van egymáshoz, minél nagyobb együtt öröklődésük gyakorisága. Az együtt öröklődés biológiai hátterét a **donor** sejtől a **recipiens** sejtbe átjutó DNS darab homológ bázispárosodása és kicserélődése (crossing over) adja. Amennyiben az átjutó DNS darab szelektálható (vagy más egyéb módon követhető) tulajdonságot hordoz, akkor a létrejött **rekombinánsok** elkülöníthetők a szülői típusoktól.

Megfelelő számú egymással együtt öröklődő (kapcsolt) markerpár alkalmazásával a kromoszóma kapcsoltsági térképe megszerkeszthető.

A Rhizobium meliloti 41 kapcsoltsági térképe az 1. ábrán látható (Kondorosi és mtsi, 1977; Vincze, 1981; Forrai és mtsi, 1983). Bár a különböző Rhizobium törzsek nagyszámú saját plazmidot tartalmaznak, melyek bizonyítottan képesek átjutni egyik baktérium-

ból a másikba (Higashi, 1967; Cole és Elkan, 1973; Bedmar és Olivares, 1980), de kromoszóma mobilizációs képességgel (Mob) nem rendelkeznek. Mob⁺ tulajdonságú Rhizobium plazmidot eddig csak Rhizobium leguminosarumból mutattak ki (Hirsh, 1979), de mobilizációs képessége olyan alacsony (10^{-7} - 10^{-8} /recipiens sejt), hogy térképezésre nem volt használható.

A P1 inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok (RP4, R68, stb.) kromoszóma mobilizációs képessége plazmidtól és recipiens-től függően már 10^{-3} - 10^{-6} /donor sejt, így kromoszóma térképezésre megfelelő. Legjobban az **R68.45** jelű plazmid (Holloway, 1978; Holloway, 1979) tulajdonságai feleltek meg kromoszóma térképezésre Rhizobium melilotiban, mert közel azonos frekvenciával indítja a kromoszóma mobilizációt a baktérium kromoszóma minden pontjáról és nagy darabokat (15-30%) képes transzferálni, valamint a képződött rekombinánsok haploidok (Kondorosi, 1977; Vincze, 1981).

Az R68.45 plazmid segítségével Rhizobium melilotiban nyert kapcsoltsági adatok additívvá tehetőek a Wu által transzdukcióra bevezetett majd Kondorosi által módosított összefüggéssel (Wu, 1966; Kondorosi és mtsi, 1977).

A Rhizobium meliloti genetikai térképének megszületése után a további markerek térképezésére egy ún. "gyorstérképezési" rendszer fejlesztettek ki (Vincze, 1981; Bánfalvi és mtsi, 1981; Forrai és mtsi, 1983). Ez a rendszer jól használható a nem szelektálható fenotípusú mutációk térképezésére is.

3. Szimbiotikus mutánsok *Rhizobium meliloti*-ban

A gümőkötésért és a gümőfunkciók fenntartásáért felelős gének azonosításának eredményes megközelítési módja szimbiózisban hibás baktérium mutánsok előállítására. Ezidáig több *Rhizobium* fajból izoláltak szimbiózisban hibás mutánsokat különböző mutagén kezeléseket alkalmazva (Maier és Brill, 1976; Buchanan-Wollaston és mtsi, 1980; Meade és mtsi 1982; Forrai és mtsi, 1983). Genetikai térképezéssel és DNS - DNS hibridizációval nyert adatok azt mutatják, hogy a szimbiózis kialakulásáért felelős gének egy része a baktérium kromoszómáján, másik (nagyobbik) része plazmido(ko)n helyezkedik el (Nuti és mtsi, 1979; Brewin és mtsi, 1980; Ruvkun és Ausubel, 1980; Bánfalvi és mtsi, 1981; Rosenberg és mtsi, 1981; Prakash és mtsi, 1981; Kondorosi és mtsi, 1984).

Nod⁻ mutánsok előállítására dolgozott ki új eljárást Zurkowsky és Bánfalvi, melynek lényege, hogy hosszú ideig magas hőmérsékleten szaporított *Rhizobium*-okban a nod géneket hordozó plazmid elveszik. (Zurkowsky és Lorkiewicz, 1978; Bánfalvi és mtsi, 1981).

Az eddig leírt nod gének mindegyike a *Rhizobium meliloti* nagyplazmidján helyezkedik el, és szorosan kapcsolódik a nagyplazmidon elhelyezkedő nif génekkel (Bánfalvi és mtsi., 1981; Rosenberg és mtsi., 1981; Kondorosi és mtsi., 1983; Long és mtsi., 1982). A nodulációs géneket két csoportra oszthatjuk: korai nodulációs génekre (Long és mtsi., 1982; Kondorosi és mtsi., 1984), valamint a

gazdaspecifitást meghatározó (hsn) génekre (Kondorosi és mtsi., 1984; Horváth és mtsi., 1986).

4. A szimbiotikus kapcsolat morfológiai vonatkozásai.

A vad típusú Rhizobium meliloti - *Medicago sativa* szimbiotikus kapcsolatának kialakulásakor a "fertőzést" követő 4-10 napon belül 1-5 mm hosszú a gyökerek epidermisz sejtjeinek burjánzásából származó struktúrák - gümők - alakulnak ki. A folyamat több jól elkülöníthető lépésre bontható (Vincent, 1980; 1. táblázat), melyek fény- és elektronmikroszkóppal jól nyomonkövethetők.

A légköri nitrogén megkötése a kialakult gümőben - közelebből a **nitrogenáz** enzimet termelő **bakteroidok**ban - folyik (Planqué és mtsi, 1977). A gümő rózsaszín elszíneződését a növényi genomban kódolt leghaemoglobin okozza (Fuehsman és Appleby, 1979).

A gümő szerkezetére a zonális felépítés jellemző (Tu, 1977). Az apikális merisztéma alatt találjuk az infekciós fonalakkal átszőtt sejtrétegeket, majd a bazális irányban a korai szimbiotikus zóna következik. Itt történik a baktériumok átalakulása bakteroidokká. Az aktív, késői szimbiotikus zóna adja a gümő nitrogénkötésben legaktívabb rétegét. A sejtek szinte teljes mértékben kitöltöttek bakteroidokkal. A szimbiotikusan aktív zónát vastag falú szklerenhima sejtek veszik körül. A gümő bazális területein a funkcionálisan inaktív, vakuolizált sejtek rétege található. Az egész gümőt kortikális sejtek rétege borítja.

Szimbiózisban hibás fenotípusú (Nod^- , Fix^-) Rhizobiumok morfológiai vizsgálata elsősorban a szimbiózis korai lépéseiben bekövetkezett defektusok azonosítására alkalmasak.

A szimbiózisban megváltozott Fix^- mutánsok túlnyomó többségében a vadtypustól eltérő alakú és szerkezetű gümők képződnek. A mutáns fenotípusú gümő kis méretű, általában fehér vagy sárga színű, és zonális felépítése megváltozik.

A Fix^- mutánsok részletesebb vizsgálata bizonyította, hogy a növényben expresszálandó szimbiotikus gének transzkripciójához legalább két bakteriális szignál (EPS, nodulin) szükséges (Govers és mtsi., 1986).

A purin és pirimidin auxotróf és pleiotropikusan Fix^- Rhizobium meliloti, valamint a riboflavin auxotróf Fix^- Rhizobium trifolii mutánsokról a citológiai vizsgálatok bebizonyították, hogy a baktérium - bakteroid átalakulás lépésében hibásak. (Pankhurst és mtsi, 1972).

A leucin és hisztidin auxotróf mutánsok az infekciós fonalból nem tudnak kiszabadulni (Truchet és Dénarié, 1973; Malek és Kowalski 1977). A cytokinin bioszintézisben hibás Rhizobium leguminosarum törzsben a baktériumok az infekciós fonalból való kiszabadulásakor nem a növényi eredetű membránnal burkolva fűződnek le a citoplazmába. Ez arra utal, hogy a növényi citoplazma nem ideális környezet a baktérium-bakteroid átalakuláshoz (Newcomb és mtsi, 1976).

Az utóbbi évek vizsgálatai elsősorban a nodulációs gének szerepét tisztázták (Török és Kondorosi, 1981; Dusha és mtsi., 1986; Kondorosi és Kondorosi, 1986; Putnoky és Kondorosi, 1986; Rostás és mtsi., 1986; Göttfert és mtsi., 1986).

- . - . -

A kísérleti adatok felhalmozódásával a szimbiotikus nitrogénkötés egyre több részlete vált tehát világossá, de még ma is keveset tudunk a folyamatban résztvevő gének pontos számáról, elhelyezkedéséről és szabályozásáról (Vincent, 1980; Kondorosi és mtsi, 1981; Ausubel, 1982; Kiss, 1986).



1. Táblázat: A gümőfejlődés szakaszai (Vincent, 1980)

Szakasz	Mutáns fenotípus szimbiózisban
I. Fertőzés: (preinfekció)	
1.a baktérium elszaporodása (ROC)	Nod ⁻
2.a baktérium kötődése a gyökérszörhöz (ROA)	Nod ⁻
3.a gyökérször elágazása (HAB)	Nod ⁻
4.a gyökérször speciális görbülése (HAC)	Nod ⁻
II. Gümő képződés: (infekció)	
1.infekciós fonál képződés (INF)	Nod ⁻
2.gümő differenciálódás (NOI)	Nod ⁻
3.baktériumok kiszabadulása az inf. fonalból (BAR)	Nod ⁺ /Fix ⁻
4.baktérium-bakteroid átalakulás (BAD)	Nod ⁺ /Fix ⁻
III. A gümő folyamatos működése:	
1.nitrogénkötés (NIF)	Nod ⁺ /Fix ⁻
2.kiegészítő biokémiai és fiziológiai funkciók (COF)	Nod ⁺ /Fix ⁻
3.a gümő funkciók fenntartása (NOP)	Nod ⁺ /Fix ⁺

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Baktérium törzsek és plazmidok.

A kísérletekben használt baktériumtörzseket és plazmidokat a 2. Táblázatban foglaltam össze.

2. Táptalajok és hígítók.

A Rhizobium meliloti 41 növesztésére élesztő - tripton (YTB) (Orosz és mtsi., 1973.), glükóz-tris-ammónium (GTA) (Kiss és mtsi 1979) komplett táptalajokat valamint glükóz-tris-szukcinát (GTS) (Kiss és mtsi., 1979) minimál táptalajt használtam. A táptalajok elkészítéséhez desztillált vizet, a baktériumok szuszpendálásához steril 0.9%-os NaCl oldatot használtam.

A szaporításnál az inkubációs hőmérséklet 30 °C volt, a kultúrákat rázatással levegőztettem.

3. Mutagenézis

3.1. NTG mutagenézis.

A kémiai mutagenézist **N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrozoguanidinnel** (NTG, Koch-Light) végeztem Kondorosi és mtsi. által leírt módszer szerint (Kondorosi és mtsi., 1973). A mutagenizált baktériumpopu-

lációt GTA komplett táptalajra egy telepre szélesztve replika technikával (Lederberg és Lederberg, 1953) GTS minimál táptalajon ellenőriztem auxotrófiára.

A GTS minimál táptalajon normál növekedést mutató kolóniákat egyenként növényi tesztben ellenőrizve válogattam ki a szimbiózisban megváltozott fenotípusú mutánsokat. Az auxotrófnak mutatkozó telepeket Holliday tesztben ellenőriztem (Holliday, 1956).

3.2. Tn5 mutagenézis

A Tn5 mutagenézist Beringer és mtsi. módszere szerint a **pJB4JI plazmid** felhasználásával végeztem (Beringer és mtsi., 1978/b). A növényi tesztben a GTS^{Km} minimál táptalajon növekvő kolóniákat ellenőriztem.

4. Genetikai térképezés, konjugáció.

A konjugációhoz késői logaritmusos fázisú (kb. 10^9 sejt/ml) baktériumokból szilárd komplett táptalaj felületén 0.1-0.1 ml-t összemértem, majd a 37 °C-on növesztettem 16 órát. A baktériumokat az inkubációs idő leteltével a táptalaj felületéről összekapartam, és 0.9%-os steril fiziológiás sóoldatban felfuszpendáltam. Az így kapott szuszpenzió alkalmas hígításait szélesztettem a megfelelő **szelektív** (GTS minimál + kiegészítés) táptalajra.

A szuszpenzióból meghatároztam a **donorok**, a **recipiensek** és a

transzkonjugánsok számát, a donor és recipiens markereinek **reverzióját**, valamint a recipiens adott markereire a **rekombinációs gyakoriságot**.

Ellenszelekcióra a szelektált markerrel nem kapcsolt markert használtam. A nem szelektált tulajdonságok együttes átjutását a szelektáltakkal replika technikával vizsgáltam (Lederberg és Lederberg, 1953).

A nem szelektálható fenotípusok (Nod^- , Fix^-) térképezését úgy végeztem, hogy az R68.45 jelű plazmidot bevezettem a mutáns törzsekbe, és kereszteztem a 7 kiválasztott kettős auxotróf recipiens törzsszel (2. táblázat), majd a szelektált prototrófokat növényi testben ellenőriztem (Vincze, 1981; Forrai és mtsi., 1983). A kiválasztott 7 recipiens törzsszel az egész Rhizobium meliloti 41 kromoszóma átfedhető.

5. Növényi teszt.

A szimbiotikus tesztet *Medicago sativa* L. (var.: Nagyszénási) növényeken végeztem. A **magvakat** 70%-os etanollal 10 percig, 0.1%-os HgCl_2 -al 3 percig és ezt követően 10%-os hypo oldattal 10 percig **sterilizáltam**. A sterilizáló oldatokat mindig frissen készítettem és steril desztillált vízzel távolítottam el a magvakról. A steril magvakat 1.0 %-os vizes agar felszínén csíráztattam.

A kicsírázott (1-3 mm hosszú) magvakat ferde 1% agart tartalmazó nitrogénmentes táptalaj felszínére helyeztem, és 24-48 óra elteltével a vizsgálandó baktérium szuszpenzió kb. 0.1 ml-es mennyiségével "fertőztem". Egy-egy baktérium vizsgálatát általában 5-10 párhuzamos csőben végeztem.

4-8 nap elteltével, a megjelenő gümők számát jegyzőkönyvben rögzítettem. Négy - hat hét elteltével a növényeket tartalmazó kémcsöveket gumidugóval (Suba - Seal) légmentesen lezártam, és kb. 0.1 ml acetilén gázt injektáltam a légtérbe. 16 - 24 óra múlva a képződött etilént gázkromatográfiásan mértem (Perkin-Elmer 3920B). Az összehasonlíthatóság érdekében - tekintettel a bemérés és a csőméret pontatlanságaira - az értékeket az

$$\frac{\text{etilén csúcsmagasság}}{10^3 * \text{acetilén csúcsmagasság}}$$

hányados képzésével értékeltem.

A szimbiotikus aktivitás másik jelzőjeként meghatároztam a növények sziklevél feletti részének szárazsúlyát is.

6. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok.

Az alkalmazott vizsgálati módszerek két csoportba oszthatók. A szimbiózis első néhány lépése (ROC, ROA, HAB, HAC; ld. 1. Táblázat) élő rendszerben vizsgálható a legjobban. A gümők szerkezetét rögzített preparátumokon fény- és elektronmikroszkóppal tanulmányoztam.

6.1. Preinfekciós jelenségek vizsgálata.

Élő vizsgálati rendszert kíván. Az alkalmazott "Fåhraeus slide" technika (Fåhraeus, 1957; Nutman, 1971) lényegét megtartva tovább módosítottam. Az eredeti eljárás szerint a csíranövényeket Fåhraeus oldatban fedőlemez alatt helyezik el, melyet a kiszáradás elkerülésére magas páratartalmú környezetbe helyeznek. Vizsgálatkor innen eltávolítva helyezik mikroszkóp alá. Ennek hátránya, hogy a vizsgálatkor elmozduló fedőlemez és az áramló folyadék általában torzítja a gyökérszőrök helyzetét.

A vizsgálataim későbbi szakaszában ezért a fedőlemez alatti folyadékot 0.1-0.2% agaróz géllal fixáltam, ami lehetőséget ad a gyökérszőrök növekedésére és a baktériumok mozgására, de könnyebben kezelhetővé és fényképezhetővé teszi a kísérleti rendszert.

6.2. A gümőszerkezet vizsgálata.

A fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a gümőket a növények gyökereiről eltávolítottam és 0.1 M nátrium - kakodilát pufferben oldott 4%-os glutáraldehidben 4 °C-on éjszakán át fixáltam. Az utófixálásra szintén 0.1 M nátrium - kakodilát pufferben oldott ozmiumtetroxidot használtam (2 óra). A fixált gümőket alkohol sorozaton keresztül víztelenítettem, és Durcupan ACM műgyantába ágyazva 50 °C-on a blokkokat kikeményítettem. A beágyazott mintákból a fénymikroszkópos vizsgálatokhoz 1 - 2 mikrométer vastag-

ságú metszeteket készítettem Zeiss ultramikrotómmal. A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a metszeteket bázikus fuxin - metilénkék festéssel színeztem (Huber és mtsi., 1968).

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a fenti módon fixált és beágyazott metszeteket 20-30 percig alkoholban oldott 50%-os uranyl - acetáttal és 15 percig ólomcitrát oldattal festettem. A metszeteket JEOL 100B és TESLA típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltam.

7. A disszertációban alkalmazott rövidítések.

- Nod⁻ - Olyan bakteriális fenotípus, mely nem képes gümőképzésre a *Medicago sativa* gyökerén.
- Fix⁻ - Olyan bakteriális fenotípus, mely gümőt képez a lucerna gyökerén, de nem képes nitrogénkötésre (növényi tesztben az acetilént nem redukálja etilénné).
- Mob** - Kromoszóma mobilizációs képesség
- Auxotrofiák - A nemzetközi megegyezés szerinti három betűs rövidítéseket használtam. Az aminosavak alkalmazott mennyisége a térképezési kísérletekben 50 mikrogramm/ml, a bázisoké pedig 25 mikrogramm /ml.

Rezisztenciák - A nemzetközi megegyezés szerinti három betűs rövidítések kromoszómális, kétbetűs rövidítések plazmid markerek esetén. Mennyiségük: str-250, rif-100, 5FU-5, Km-400, Tc-15 mikrogramm/ml.

2. Táblázat: A kísérletekben használt baktériumtörzsek jegyzéke.

Baktériumok:	Markerek	Forrás
AK631	Nod ⁺ ,Fix ⁺ vadtípusú Rhizobium meliloti 41	Kondorosi és mtsi. 1977
AK684	Nod ⁺ ,Fix ⁺ str-1 Rhizobium meliloti 41	AK631
TF178	AK 684 Fix-2::Tn5 Rhizobium meliloti 41	AK684
JA5, JA7	AK684 Fix-3::Tn5, Fix-4::Tn5 Rhizobium meliloti 41	AK684
GY561	Nod-1 Rhizobium meliloti 41	Bánfalvi és mtsi., 1981
ZB125	Nod-2::Tn5 Rhizobium meliloti 41	Forrai és mtsi., 1983
ZB138	Nod-3::Tn5	Bánfalvi és mtsi., 1981
EV119*	cys-46, str-1, rif-1	Vincze, 1981
EV196*	cys-46, phe-15, str-1, rif-1	" "
EV197*	phe-15, leu-4, str-1, rif-1	" "
EV199*	leu-4, gly-1, str-1, rif-1	" "
EV207*	gly-1, ade-4, trp-15, str-1, rif-1, (R.68.45)	" "
EV88*	trp-15, narB-15, gen-1	" "
EV44*	ade-15, str-1, narB-15	" "
ZB178	ade-15, rif-1, narB-15	" "

*A kiválasztott 7 recipiens törzs (Ld. a szövegben)



2. Táblázat (folytatás).

Plazmidok:	Markerek	Forrás
R68.45	Cb ^r , Km ^r , Tc ^r Cma ⁺ IncP1	Haas és Holloway, 1976
pJB4JI	Gm ^r , Sm ^r , ::Mu::Tn5 IncP1	Beringer és mtsi., 1978/b

IV. EREDMÉNYEK

1. Szimbiózisban hibás mutánsok előállítása

A Rhizobium meliloti genetikai rendszerének létrehozása kapcsán csoportunkban több mutagén kezelést, többféle technikával végeztünk. Így Kondorosi Ádám és Bánfalvi Zsófia Tn5 technikával, Kiss György Botond NTG mutagenézissel, Bánfalvi Zsófia hőkúrálással állítottak elő Rhizobium meliloti mutánsokat. Jelen doktori disszertációmban az általuk előállított mutánsok egy részének vizsgálatát is végeztem.

A szimbiózisban hibás mutánsok előállítására általános megközelítési módot alkalmaztam. A Rhizobium meliloti 41-et NTG-vel és Tn5-el mutagenizáltam, majd az egy telepre szélesztett, minimál táptalajon növekvő kolóniákat egyenként ellenőriztem növényi tesztben. A szimbiózisban hibásnak talált mutánsokat két csoportba soroltam:

- a./ Mutánsok, melyek nem képesek gümőkötésre a *Medicago sativa* L. (lucerna) gyökerén (Nod^-).
- b./ Mutánsok, melyek képeznek ugyan gyökérgümőt, de nitrogénkötésre képtelenek (Fix^-).

Mivel nagyszámú génmutáció okoz szimbiózisban hibás fenotípust - pl. aminosav és bázis auxotrófiák egy része ineffektív fenotípusú - az egyedi telepeket a szimbiotikus tulajdonságok vizsgálata

előtt minimál táptalajon növesztettem és csak azokat a mutánsokat teszteltem szimbiózisban, melyek növekedésükhöz nem igényeltek ki-egészítést.

A különböző technikával végzett mutagenizálások eredményeit a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. Táblázat. Mutáns fenotípusok megjelenési gyakorisága

Mutagenезis	Vizsgált telepszám	auxotróf	Nod ⁻	Fix ⁻
N T G	3900 db	26 db	3 db	42 db
T n 5	4550*db	20*db	3*db	15*db

Az auxotrófnak talált mutánsokat Holliday tesztben ellenőriztem.

Az auxotrófnak számának vizsgálata módot nyújt a mutagenезis hatásosságának ellenőrzésére is. Ezért a mutagenizált populációból megvizsgáltam az auxotrófnak megjelenési gyakoriságát és a mutáns fenotípusok eloszlását. Az eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

*Az adatok Bánfalvi Zsófia és Kondorosi Ádám mutagén kezeléseinek eredményeit is tartalmazzák.

4. Táblázat. Auxotróf fenotípusok eloszlása

Fenotípus	NTG db	Tn5 db	összesen db
Hys ⁻	2	-	2
Cys⁻	5	3	8
Pur ⁻	3	2	5
Pyr ⁻	4	1	5
Met⁻	2	3	5
Leu ⁻	2	-	2
Gly ⁻	1	-	1
Tyr ⁻	1	1	2
Try ⁻	4	2	6
Cyt ⁻	1	-	1
Arg ⁻	1	1	2
Trp ⁻	-	2	2
Thy ⁻	-	3	3
Lys ⁻	-	2	2

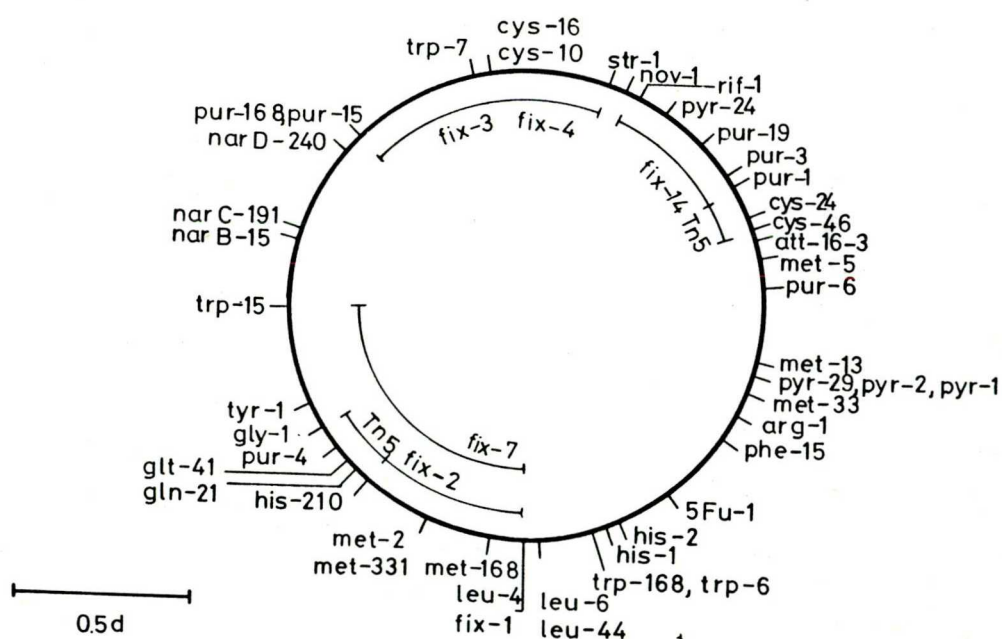
Az 4. táblázat adatai azt mutatják, hogy a mutációk véletlenszerűen oszlanak el. Megjelenésük valószínűsége nagyjából azonos, kivéve a **kénanyagcsere mutánsok** megjelenését, mely ebből az átlagból kiemelkedik.

Az auxotróf mutánsok revertáltathatók prototróffá. A Tn5 mutagenézisből származó mutánsok prototróf revertánsai egyben **kanamycin** szenzitívvé is váltak, mely a Tn5 meglehetősen pontos kivágódására utal.

2. A Nod⁻ és Fix⁻ mutációk genetikai analízise

A Rhizobium meliloti 41 kromoszóma kapcsoltsági térképe (Kondorosi és mtsi, 1977/b; Kondorosi és mtsi 1980; Vincze és mtsi, 1981; Forrai és mtsi., 1983) auxotrófia és rezisztencia markereket tartalmaz (1. ábra).

1. ábra. A Rhizobium meliloti 41 kromoszóma kapcsoltsági térképe



Ezek a mutációk adnak keretet a kromoszómális mutációk helyének megállapítására. Mivel a szimbiózisban hibás mutánsok nem rendelkeznek szelektálható fenotípussal szabadonélő körülmények között, az ilyen mutációk kromoszómális térképezésére új stratégiát kellett kidolgozni.

Az R68.45 plazmid segítségével (Haas és Holloway, 1976) végzett kromoszóma mobilizáció esetén a Rhizobium meliloti 41-ben nagy kromoszóma darabok jutnak át és épülnek be a recipiens baktérium DNS-ébe. Bizonyított továbbá, hogy az átkerült DNS szakaszon a többszörös crossing over gyakorisága relatíve alacsony (Kondorosi és Johnston, 1981; Vincze, 1981). Amikor két donor marker együtt öröklődik, akkor az alacsony többszörös crossing over gyakoriság miatt a közöttük levő markerek kb. 90 %-ban szintén együtt öröklődnek. Ha jól kiválasztott recipiens törzsekkel (2. táblázat) elvégezzük a keresztezéseket, akkor az így rendelkezésünkre álló markerpárokkal az egész Rhizobium meliloti kromoszómát átfedhetjük.

2.1. NTG indukált mutánsok térképezése.

A térképezés általános stratégiája (Vincze, 1981) az, hogy a térképezendő markert hordozó baktériumba bevezetjük az R68.45 plazmidot, és az így előállított donor törzse(ke)t keresztezzük külön-külön a 7 recipiens törzsszel, majd a kettős rekombinánsokat ellenőrizzük a térképezendő markerre.

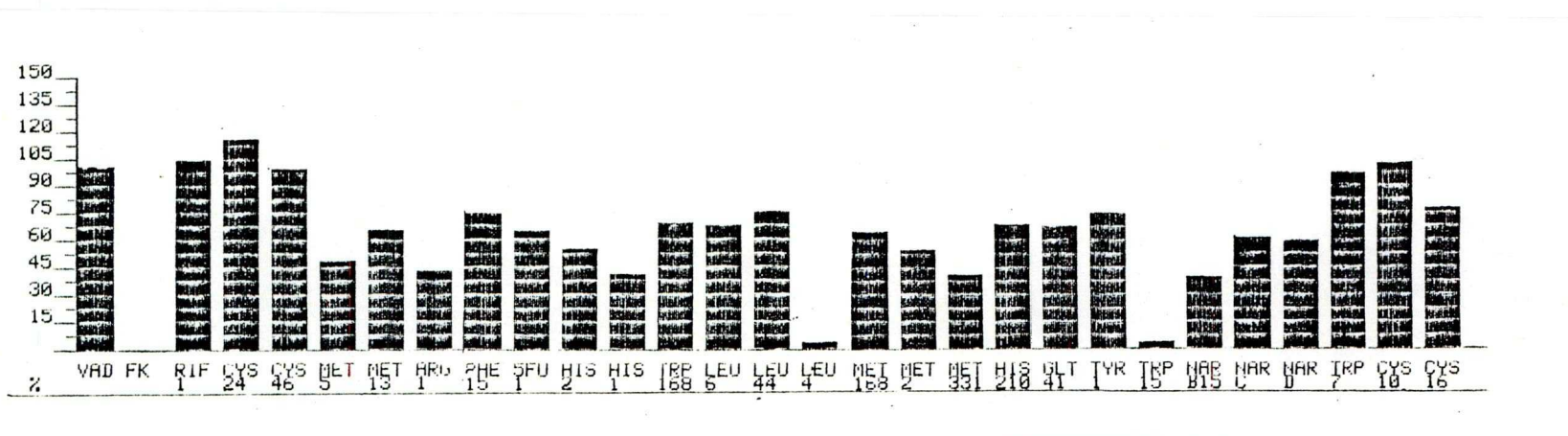
Fenti stratégiát követve hoztunk létre donor törzseket a szimbiózisban hibásnak talált Rhizobium meliloti 41 mutánsokból, majd a keresztezéseket elvégezve a kapott rekombinánsokat növényi tesztben ellenőriztük.

A kontrollként elvégzett kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a recipiensként használt törzsek mindegyike Nod^+ fenotípusú, bár néhányuk szimbiotikus aktivitása csökkent (2. ábra). A vad típusú donorral elvégzett keresztezésekkor azonban mindegyikük aktivitása tökéletesen helyreállt. A kromoszómális auxotrófia és rezisztencia mutációk hatását a szimbiotikus aktivitásra a 2. ábrán foglaltam össze. A Nod^- térképezések eredményeit az 5. táblázat tartalmazza.

5 táblázat. Rhizobium meliloti 41 Nod^- mutánsok térképezése.

Szelektált markerpárok		Nod ⁻ tulajdonság megjelenése a rekombinánsokban (%)		
		Nod-1	Nod-2	Nod-3
str-1 ⁺	cys-46	0	0	0
cys-46	phe-15	0	0	0
phe-15	leu-4	0	0	0
leu-4	gly-1	0	0	0
gly-1	trp-15	0	0	0
trp-15	narB-15	0	0	0
narB-15	pur-15	0	0	0
pur-15	str-1 ⁺	0	0	0

2. ábra Auxotróf mutációk hatása az acetilén redukciós aktivitásra (Rhizobium meliloti 41)



Az oszlopdiagramok a vad típusú Rhizobium meliloti 41 acetilén redukciós aktivitásának %-ában mutatja az egyes mutánsok értékeit. (vad = Rm 41 100% FK = fertőzetlen kontroll 0 %)

A vizsgált Nod^- mutációk térképezésénél nem kaptam kapcsoltságot egyetlen kromoszómális régióval sem, ami valószínűsíti azok extrakromoszómális elhelyezkedését. A szimbiotikus aktivitásokat a Fix^- donorral képzett kettős rekombinánsok esetén az acetilén redukciós értékekből számoltam. Az értékelés ezen módja nehezebb volt mint a Nod^- -ok esetében mert az acetilén redukciós módszerrel nyert adatok természetüknél fogva jóval nagyobb szórással rendelkeznek. A 6. táblázatban foglaltam össze a Fix^- mutánsok térképezésének eredményeit. A táblázatban szereplő 5FU-1 marker térképezési adatai a rendszer kontrolljaként szolgálnak. Az 5FU-1 egy szelektálható fenotípusú rezisztencia marker, melynek térképezése nem csak ebben a rendszerben történt meg, hanem ismertek más markerekhez viszonyított kapcsoltsági adatai is. (Az 5FU-1 térképezésére vonatkozó adatok Vincze Éva doktori disszertációjából származnak.).

A 6. táblázat adataiból látható, hogy a $Fix-7$ mutációt a $leu-4 - gly-1$ kromoszómális régióba lokalizáltam. Az adatok szerint a $Fix-5$ mutáció nem térképeződik kromoszómára. Hasonlóképpen nem találtam kromoszómális kapcsoltságot a $Fix-6$ és $Fix-8$ NTG indukált mutációk esetén sem.

2.2. Tn5 transzpozícióval előállított mutánsok térképezése.

A transzpozíciós technika alkalmazása (Beringer és Mutsaers, 1978/b) lehetőséget ad arra, hogy nem szelektálható fenotípusú mutációkat a Tn5 által hordozott kanamycin rezisztencia marker segítségével

6. táblázat. Szimbiózisban hibás Rhizobium meliloti 41 Fix⁻ mutánsok térképezése.

Szelektált markerpárok		Fix ⁻ tulajdonság megjelenése a rekombinánsokban (%)							
		5FU-1*	Fix-2	Fix-3	Fix-4	Fix-5	Fix-6	Fix-7	Fix-8
str-1 ⁺	cys-46	0	14	19	0	0	0	0	80
cys-46	phe-15	84	14	16	44	0	2	0	82
phe-15	leu-4	100	60	67	20	4	40	0	44
leu-4	gly-1	16	100	58	58	0	20	91	13
gly-1	trp-15	10	35	64	85	4	10	76	88
trp-15	narB-15	0	14	32	23	4	4	27	36
narB-15	pur-15	0	10	53	71	8	2	0	60
pur-15	str-1 ⁺	0	10	100	100	4	37	29	52
Kromoszómális		phe-15	leu-4	pur-15	pur-15	-	-	leu-4	-
térképhelyzet		leu-4	gly-1	str-1	str-1			trp-15	

*(Vincze, 1981)

nyomon tudjunk követni. Kondorosi Ádám és Bánfalvi Zsófia vizsgálatai bizonyították, hogy Rhizobium meliloti-ban a transzpozícióval beépült DNS darabok másodlagos transzpozíciója gátolt.

Nagyon nagy gyakoriságú (0.1-1.0) plazmid átvitel mellett is a kanamycin rezisztencia kisebb mint 10^{-9} -es gyakorisággal volt képes helyet változtatni. (Ugyanilyen körülmények között a kanamicin rezisztencia *E. coliban* 10^{-5} -es gyakorisággal változtat helyet!)

A fenti eredmények azt igazolják, hogy a Rhizobium meliloti-ban a Tn5 (és az a DNS szakasz amibe beépült) egyszerű kanamycin rezisztencia markerként kezelhető. A vizsgálatok szerint 13 esetből 8-ban a kanamycin rezisztencia és a szimbiotikus mutáció **100%**-os kapcsoltságot mutatott, azaz 13 esetből 8-ban a Tn5 beépülése okozta a Fix^- mutációt.

Az NTG kezelt szimbiotikus mutációk térképezéséhez hasonló technikát alkalmazva meghatároztam a **Fix-2** jelű Tn5 indukált mutáns térképhelyzetét is, mely a **leu-4 - gly-1** kromoszómális régióra lokalizálható (6. táblázat). A Bánfalvi Zsófia által függetlenül elvégzett kanamycin rezisztencia térképezése a Tn5 beépülési helyét ugyanerre a régióra mutatta ki.

A szintén Tn5-el indukált **Fix-3** és a **Fix-4** mutánsok térképhelyzete a **pur-15 - str-1** régióban található.

3. A gümőfejlődés vizsgálata Rhizobium meliloti 41 - Medicago sativa szimbiózis kialakulásakor

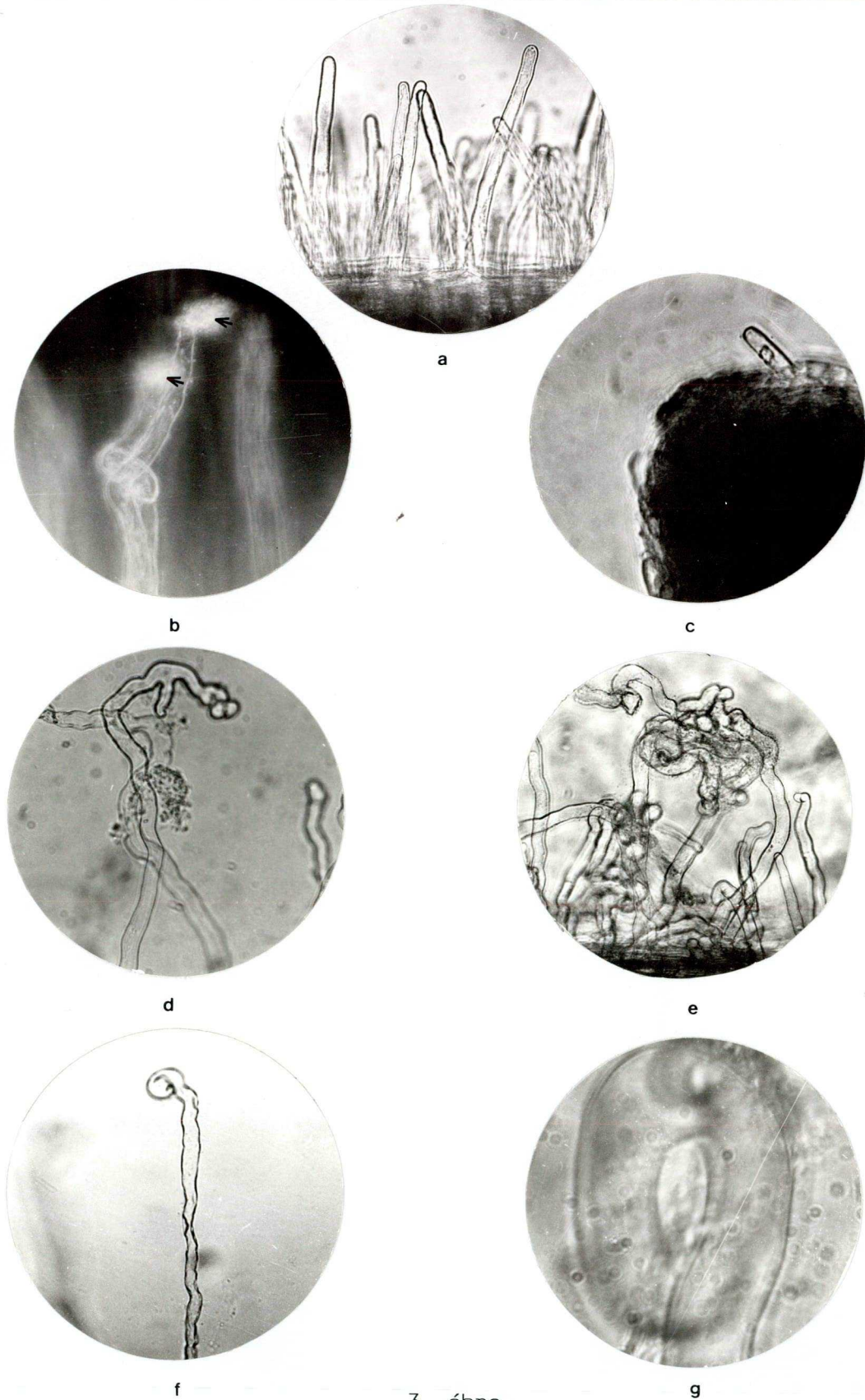
3.1 A vad típusú gümő szerkezete.

Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztem annak megállapítására, hogy a Rhizobium meliloti 41 által indukált gümők fejlődése és szerkezete mutat-e eltérést más Rhizobiumok által indukált gümöktől.

A Vincent féle felosztást (1. táblázat) követve vizsgáltam a gümőfejlődés egyes lépéseit. A módosított Fåhraeus technikát alkalmazva jól megfigyelhetők a **preinfekciós**- (3 ábra), és az **infekciós** lépések (4. ábra) Rhizobium meliloti 41-el fertőzött lucerna növények gyökerén, ill. fény- és elektronmikroszkóppal a **bakteroid képződés** és a **gümő szerkezet** (5. 6. 7. 8. 9. 10 ábrák).

Megállapítottam, hogy a Rhizobium meliloti 41 vad típusú baktérium által indukált gümők struktúrája lényegileg nem különbözik más szimbiotikus baktériumok által létrehozott gümők szerkezetétől. Megtalálható az **infekciós fonalak rétege** a bakteroidokkal zsúfolt **korai nitrogénkötő** és **késői nitrogénkötő** zóna, valamint az előregedett **funkcionálisan leépülő sejtek** zónája.

Az 5. ábrán egy 6 hetes, vad típusú Rhizobium meliloti 41 (AK 631) által indukált gümő hosszmeteszét láthatjuk (N: 40x).



3. ábra.

3. ábra: Preinfekciós jelenségek a Rhizobium meliloti 41 Medicago sativa szimbiózis kialakulásakor.

a./ Lucerna növény gyökérszőrök Rhizobium meliloti 41-el "fertőzve" 0. nap. (N: 20x)

b./ Sötét látóteres felvétel. Lucerna növény gyökérszőrök Rhizobium meliloti 41-el "fertőzve" 3. nap. Jól látható a gyökérszőrök csúcsánál elszaporodott baktérium felhő (ROC/ROA - nyíl) (N: 40x)

c./ A baktérium adszorpciója a gyökérszőr csúcsához (ROA) (N: 160x)

d./ - e./ Gyökérszőr elágazási formációk (HAB). (N: 40x). Nem csak a szimbionta partner idézi elő, más baktériumok, vagy mechanikai szennyeződések (pl. homokszem) is előidézhethet.

f./ A gyökérszőr speciális görbülése (HAC) (N: 40x)

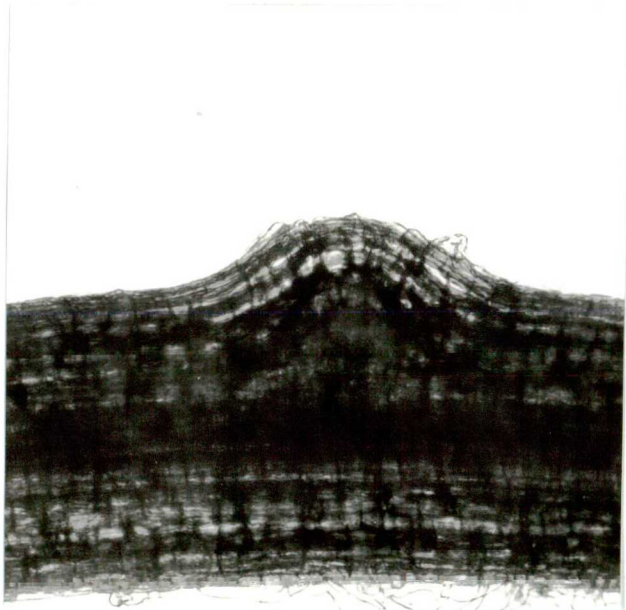
g./ Tipikus HAC reakció un. "shepherd's crooks". Fontos lépés, melyet csak a szimbionta partner képes előidézeni.



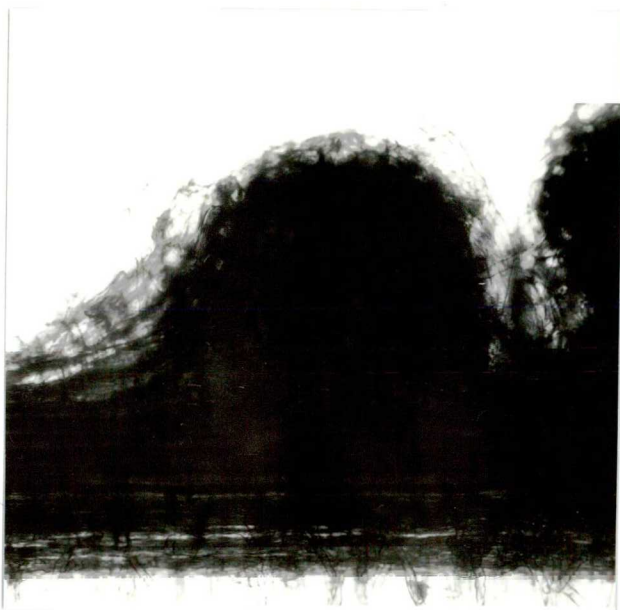
a



b



c



d

4. ábra.



4. ábra Infekciós és gümőképződési jelenségek a Rhizobium meliloti 41 Medicago sativa szimbiózis kialakulásakor.

a./ A baktérium behatolása után a gyökérszőrben un. infekciós fonalat képez, melyen keresztül a gyökér merisztematikus sejtjei felé halad (INF) (N: 40x).

b./ Infekciós fonal a gyökérszőrön belül (nyíl) (N:160x)

c./ Megindul a merisztematikus sejtek differenciálódása (NOI) (N: 20x)

d./ Differenciálódott gümő (N: 20x)



5. ábra Rhizobium meliloti 41 Medicago sativa szimbiózis során kialakult nitrogénkötő gümő hosszmeteszete.

(M) merisztéma; (IF) infekciós fonalak rétege; (ES) korai nitrogénkötő zóna; (LS) késői nitrogénkötő zóna; (NC) gümő kortikális sejtrétege; (SC) sclerenchyma sejtek.

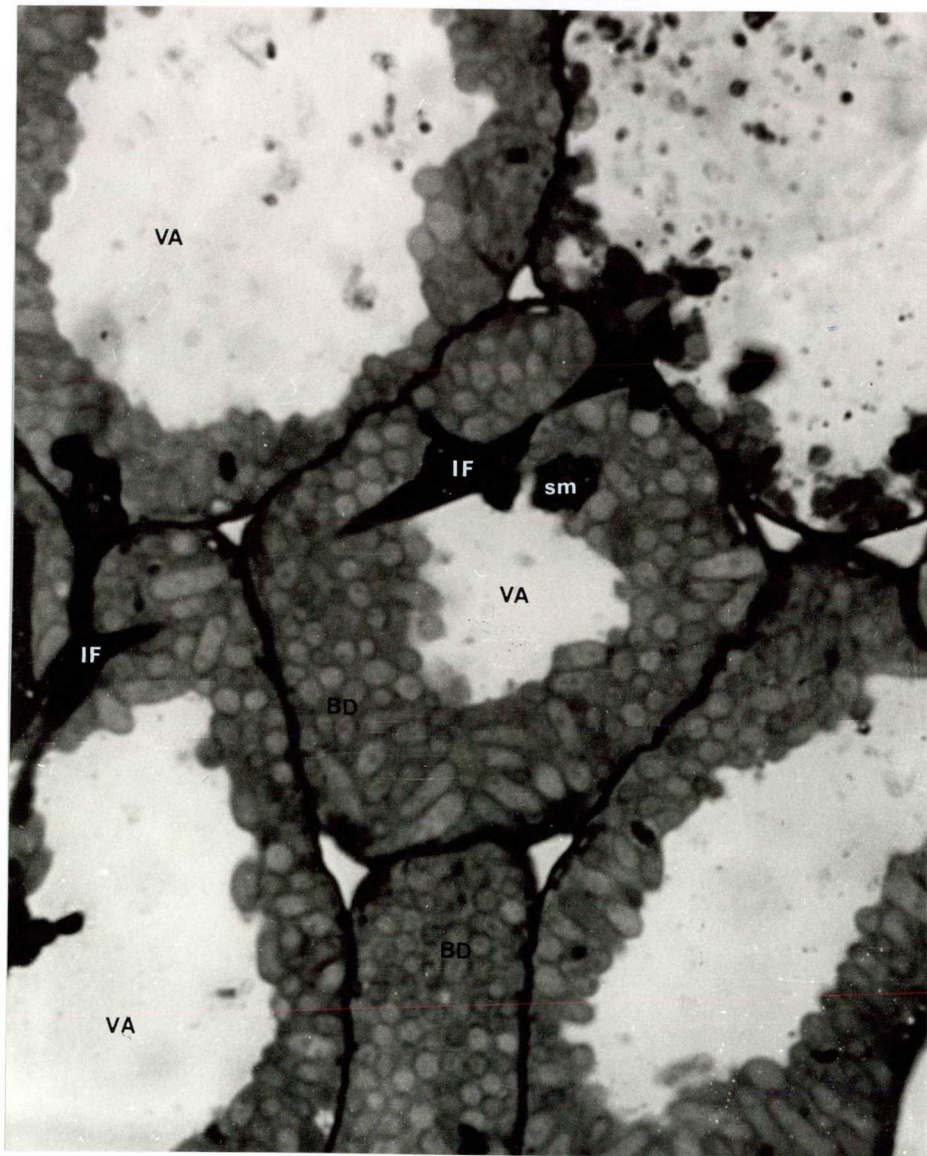


6. ábra: A Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő szerkezete
Az infekciós fonalból (IF) a növényi sejtbe lefűződő Rhizobium meliloti 41 (BM) elektronmikroszkópos képe.



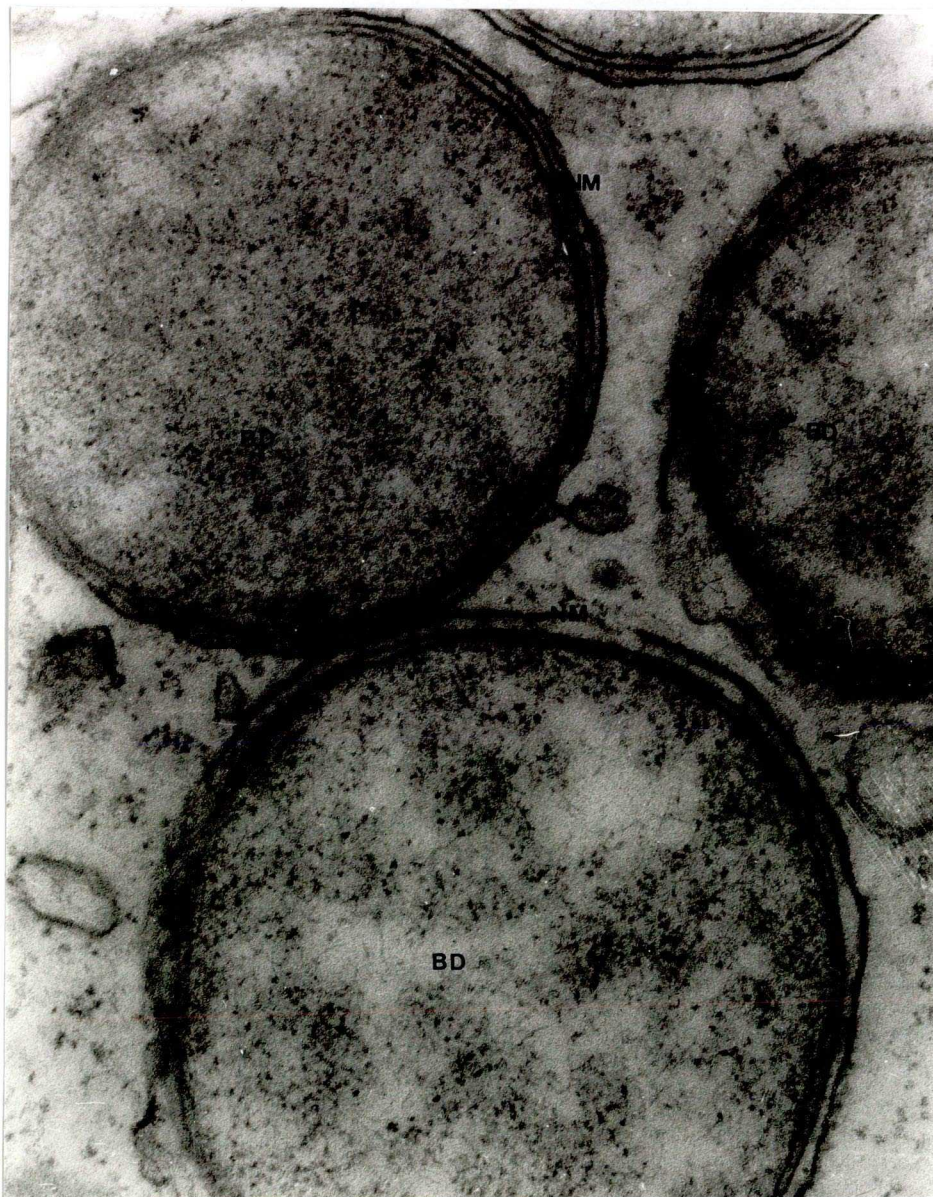
7. ábra: A Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő szerkezete
A korai nitrogénkötő zóna sejtrészlete a bakteroid (BD) és egy tubuláris mitochondrium (MC) hosszmetsetével.





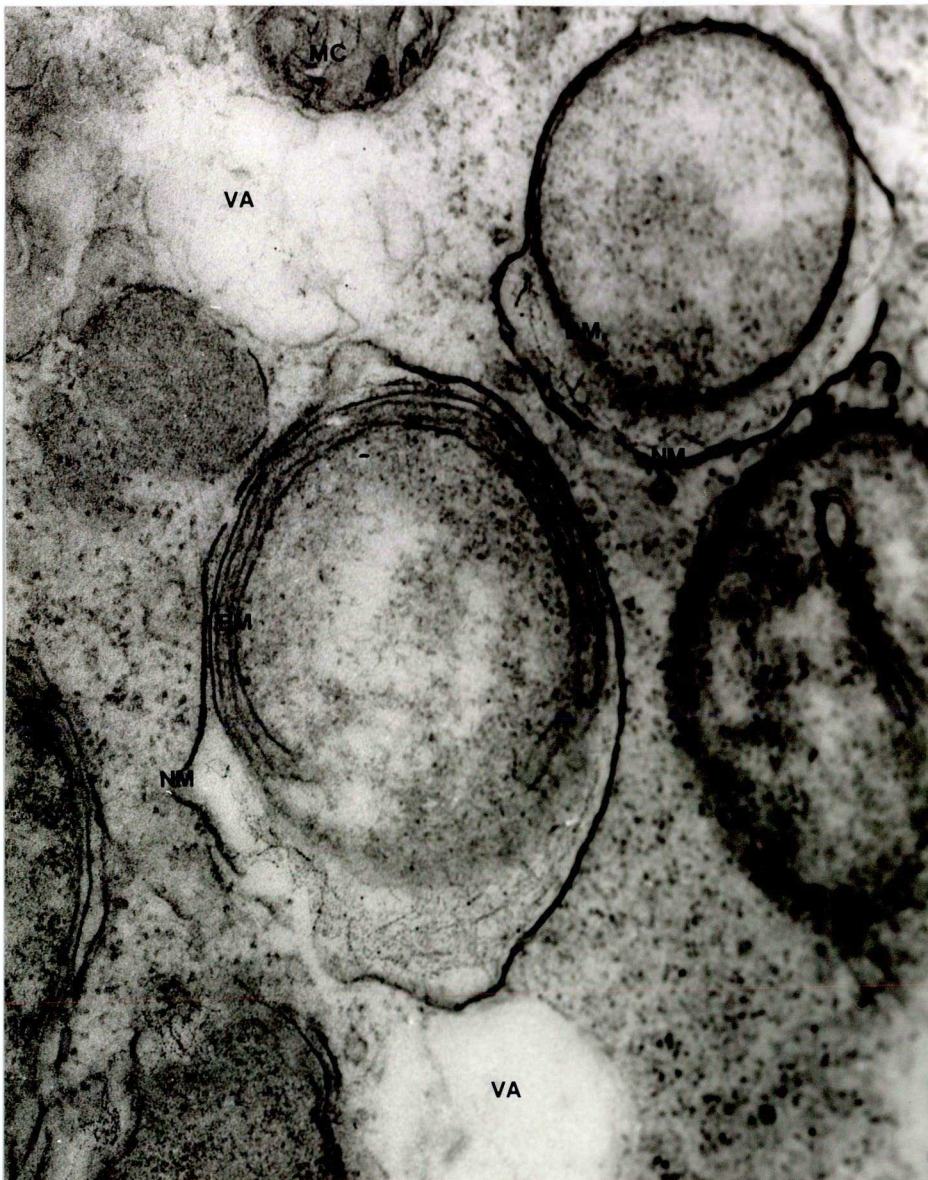
8. ábra: A Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő szerkezete

A késői nitrogénkötő zóna egy sejtje, melyen látható a sejtbe nyomuló infekciós fonál (IF) valamint a bacteroiddá alakult baktériumok tömege (BD). A sejt közepén a vakuolum (VA), a vakuolum szélén a sejtmag (SM) látható (N: 400x)



9. ábra: A Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő szerkezete

A késői nitrogénkötő zóna elektronmikroszkópos képe. Jól látható a bakteroidokat (BD) határoló bakteriális eredetű kettős membrán (BM), valamint a sokkal kompaktabb növényi sejtmembrán (NM).



10. ábra: A Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő szerkezete
Részlet a nitrogénkötő gümő bazális területéről. Jól megfigyelhetők a széteső növényi- (NM) és bakteriális membránok (BM), az erős vakuolizáció (VA) és a degradálódott mitochondriumok (MC).

3.2. A szimbiózisban hibás mutánsok morfológiai jellemzése.

A mutánsok előzetes karakterizálását a szerkezeti vizsgálatoknál is követett Vincent féle rendszer szerint csoportosítva végeztük. Megvizsgáltuk az eltérő módon előállított Nod^- mutánsok esetében a gyökérszőrök elágazását és u.n. "speciális görbülését".

Ez a jelenség a baktériumok gyökérszörhöz való tapadásának (ROA), ill. a gyökérszörbe való behatolásának (INF) következménye, és bizonyítja az u.n. preinfekciós tulajdonságok meglétét. Tipikusan növényi reakció. A vad típusú baktériummal végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a gyökérszőrök görbülése a "fertőzés" utáni 3. - 4. naptól kezdve biztonsággal kimutatható és még a növény 4 hetes korában is hasonló módon értékelhető.

A mutánsok vizsgálatának eredményeit az alábbi táblázat tartalmazza.

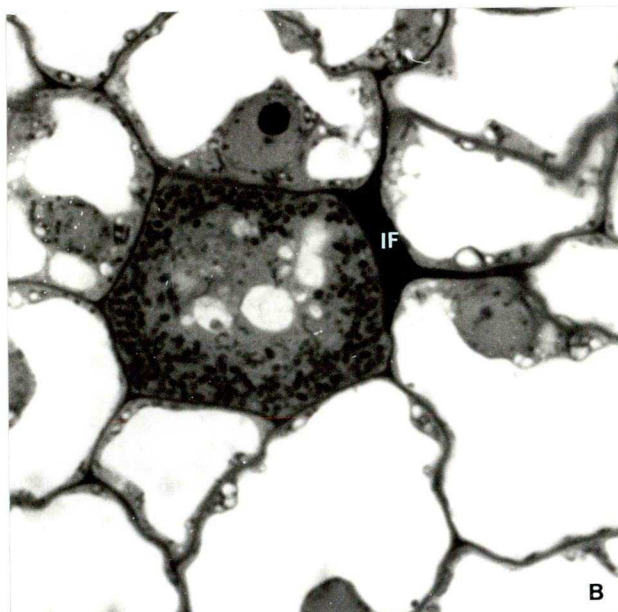
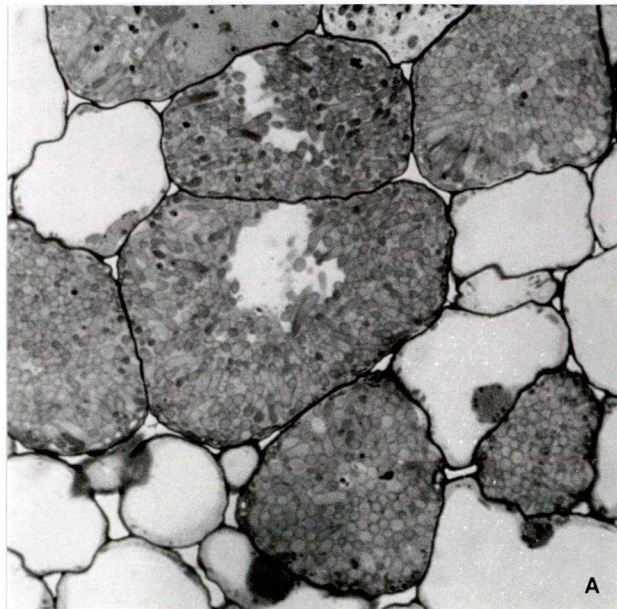
7. táblázat. A szimbiózisban hibás (Nod^-) baktériumok gyökérször görbülést előidéző (HAC) fenotípus vizsgálata.

Mutagenézis	NTG	Tn5	Hőkezelt*
Hac+	2	2	8
Hac-	1	1	41

* A mutánsokat Bánfalvi Zsófia állította elő (Bánfalvi és mtsi., 1981)

A táblázat adataiból látható, hogy az eltérő technikával mutagenizált Nod^- fenotípusú mutánsok tovább csoportosíthatók. Ugyancsak további csoportosításra ad lehetőséget a gümőszerkezet vizsgálata fény és elektronmikroszkóppal.

A Fix-2:: $Tn5$ fenotípusú mutáns struktúrális vizsgálata valószínűsíti, hogy a mutáció a baktérium - bakteroid átalakulás lépését érintette. A vad típussal ellentétben nem található meg a zonális felépítés, és a sejteket vizsgálva nem láthatunk átalakult bakteroidokat sem. (11. ábra).



11. ábra A szimbiózisban megváltozott (Fix^-) és vad típusú gümő-szerkezet összehasonlítása.

Vad típusú baktériummal fertőzött gümő keresztmetszete a korai nitrogénkötő zóna magasságában (a.); a $\text{Fix-2}::\text{Tn5}$ mutánsal fertőzött gümő keresztmetszete (b.).

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

1. Mutagenézis.

Míg az NTG mutagenézis főképpen revertáltatható pontmutációkat eredményez, addig a Tn5 inszerciós mutagenézis erősen poláris hatású, mutációk képződését indukálja (Berg, 1977; Forrai és mtsi., 1983). A kétféle mutagén technika alkalmazásával feltehető, hogy eltérő génekben hibás mutációkat sikerült nyerni.

A kapott Fix⁻ mutánsok száma a mutagenézisek egészét tekintve kb. 10x-ese a Nod⁻ mutánsok számának. Korábbi, ugyancsak NTG-vel mutagenizált Rhizobium japonicum (Maier és Brill, 1976), valamint Rhizobium leguminosarum (Beringer és mtsi., 1977) szimbiotikus mutánsok elemzéséből kapott eredményei azt mutatták, hogy különbségek vannak a kapott Nod⁻ és Fix⁻ mutánsok számában. Egyes szerzők vizsgálatai (Bánfalvi és mtsi., 1981; Kondorosi és mtsi., 1981; Long és mtsi., 1982; Kondorosi és mtsi., 1983/b; Putnoky és Kondorosi, 1986) azt mutatják, hogy a nodulációért felelős gének a Rhizobium megaplazmid relatíve kis régióját foglalják el, ami arra utal, hogy a nodulációért csak kevés gén felelős.

A számbeli eltérés azonban nem szükségszerűen jelenti, hogy hasonló mértékű az eltérés a Rhizobiumok nod és fix génjei között (Beringer és mtsi., 1980). Míg a Nod fenotípus a vizsgálatokban

"igen-nem" típusú választ ad eredményül (és így egyetlen nod^+ revertáns Nod^+ fenotípust eredményezhet), addig a Fix^- fenotípus vizsgálatakor statisztikus értékelést alkalmazunk, amit kevésbé zavar a Fix^+ revertánsok megjelenése.

Más részről ismert, hogy nagyon sok biokémiai mutáns (aminosav auxotrofok, antibiotikum rezisztensek) rendelkeznek Fix^- fenotípussal (Schwinghammer, 1964; Schwinghammer, 1968; Scherrer és Denarié, 1971; Denarié és mtsi., 1976; Zelezná-Kowalska, 1977; Zelezná-Kowalska, 1978). Saját vizsgálataimban is azt tapasztaltam, hogy a térképezéshez használt auxotrof recipiens párok meglehetősen változatos aktivitást mutattak szimbiotikus tesztben (ld. 2. ábra). Mivel a mutagenizált populációkat a Holliday tesztben csak aminosav auxotrofiákra ellenőriztem, a nagyszámú Fix^- fenotípus megjelenését az antibiotikum rezisztens mutánsok is okozhatták. Éppen ez okból a térképezésben használt mutánsokat előzetesen a genetikai térképen már szereplő rezisztencia markerekre is ellenőriztem.

A szimbiotikus nitrogénkötésért felelős gének nem rendelkeznek szelektálható fenotípussal, a rekombinánsok genetikai analízise a növényi teszt alkalmazása miatt lassú és nehézkes. A nehézségeket elsősorban a Tn5 technika alkalmazásával kerülhetjük ki (Beringer és mtsi. 1978/a), ami a Km^r követésével a vizsgált mutációt szelektálhatóvá teszi. A Tn5 módszer alkalmazása azonban megköveteli a vizsgált tulajdonság és a Km^r kapcsoltságának bizonyítását.

Forrai és mtsi. leírták, hogy a növényi tesztben, Fix^- vagy Nod^- fenotípust mutató Tn5 indukált mutánsok 40%-ban nem mutattak kapcsoltságot a Km^r markerral (Forrai és mtsi., 1983). A jelenségre többféle magyarázatot találhatunk. Ismert, hogy a transzpozíciós elemek jelenléte a genomban növeli deléciók kialakulásának valószínűségét (Berg, 1977), ill., hogy a Tn5 jelenléte aktivizálja a Rhizobium meliloti megaplazmidokon jelenlévő ISRm2 szekvenciákat (Dusha és mtsi., 1987), melyek a szimbiotikus génekbe épülve azok funkciójának megszűnését okozzák. A Tn5 használatának másik problémája, hogy a Tn5-el együtt a Mu fág szekvenciák is transzponálódhatnak, ami instabillá teszi a régiót és gyakran indukál deléciókat (Bánfalvi és mtsi., 1981; Meade és mtsi., 1982).

2. A mutánsok genetikai analízise

Felhasználva a Rhizobium meliloti különböző technikákkal izolált szimbiózisban hibás mutánsait és a korábban megalkotott genetikai térképét 3 Nod^- és 7 Fix^- mutációt térképeztem az R68.45 plazmid használatára épített konjugációs rendszerben. Tekintetbe véve a csoportban mások által is térképezett Fix^- mutációkat úgy látszik, hogy a szimbiotikus gének csak egy (kisebbik) része lokalizálható a baktérium kromoszómájára, túlnyomó többségük extrakromoszómálisan helyezkedik el. A kromoszómára térképezett mutációk

nem egy csoportban helyezkednek el. Ezek a vizsgálatok bizonyították első ízben, hogy a szimbiózisban **kromoszómális gének** is részt vesznek (Forrai és mtsi., 1983). A mutagenézisek után kapott auxotrófok vizsgálata a szimbiózisban, valamint az auxotrófok és a szimbiózisban hibás mutánsok számának összehasonlítása azt valószínűsíti, hogy igen nagyszámú Rhizobium gén vesz részt a nitrogénkötő bakteroidok fejlődésében és a szimbiózis egyes folyamataiban a gümő működése folyamán.

3. A gümőfejlődés lépéseinek vizsgálata.

A vad típusú Rhizobium meliloti 41 esetében az - elvileg ismert - alapvető jelenségek tisztázása adott lehetőséget a megfelelő technikák elsajátítására, mely a mutánsok csoportosításában is nélkülözhetetlen volt. A vizsgálatok eredményei bizonyították, hogy a Rhizobium meliloti 41 esetében is érvényesek a már korábban tett megállapítások a gümőfejlődés lépéseit illetően (Vincent 1980).

A gyökérszőrök speciális görbülésének (HAC) vizsgálatával a Nod⁻ mutánsok újabb - további - csoportosítása vált lehetővé (7. táblázat).

4. Gümőszerkezeti vizsgálatok.

A Rhizobium meliloti 41 vad típusú baktérium által indukált gümők szerkezete nem mutat lényeges eltérést a korábban más Rhizobium fajoknál leírtakkal (Truchet és Dénarié, 1973; Newcomb és mtsi 1977; Tu, 1977; Patel és Yang, 1980; Hirsh és mtsi., 1982).

Az 5. ábrán látható Rhizobium meliloti 41-el fertőzött gümő hosszmetsetén jól megkülönböztethető a zonális felépítés. Az irodalmi adatoktól eltérést itt sem tapasztaltam, de a konkrét Rhizobium faj gümőszerkezete eddig feltáratlan volt.

A 11. ábrán látható az AK 631 (Rhizobium meliloti 41 vad típusú) és a TF 178 (Fix-2::Tn5) mutánssal fertőzött gümő fénymikroszkópos összehasonlítása. Mint észrevehető a mutánssal indukált gümő nem tartalmaz bakteroidokat, és az infekciós fonálból kiszabaduló néhány baktérium nem képes átalakulni.

A későbbi vizsgálatok bizonyították (Putnoky és mtsi., 1988), hogy a Fix-2 (TF 178) Tn5 mutagenézisből származó mutáns által indukált gümőben sem a nif gének, sem a növényi nodulinok (leghaemoglobin, nod-25) mRNS-ei nem mutathatók ki.

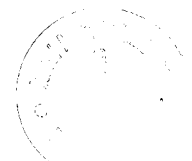
Az a tény, hogy a biológiai nitrogénkötés illetve a szimbiotikus kapcsolat kialakításában mindkét partner genetikai állományából származó, nagyszámú gén vesz részt, egyenlőre kérdésessé teszi annak a régi vágnak a megvalósulását, hogy a természetes úton kialakult biológiai nitrogénkötési folyamatot a jelenleg ismeretes géntechnikai módszerekkel átvihessük a mezőgazdaságban fon-

tos és nagy tömegben termesztett növényfajokba (búza, kukorica, stb). A növényi oldalról felvetődő kérdések vizsgálata pedig csak napjainkban kezdődött meg.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A Rhizobium meliloti 41 - Lucerna szimbiotikus kapcsolatának vizsgálata során az alábbi fontosabb eredményeket értem el:

- Kétféle mutagén technikát alkalmazva szimbiózisban hibás (Nod^- és Fix^-) mutánsokat állítottam elő a Rhizobium meliloti 41 baktériumból.
- Használva a Rhizobium meliloti 41 genetikai rendszert és térképezési eljárásokat, első ízben sikerült a Rhizobium meliloti 41 3 Nod^- és 7 Fix^- mutánsának térkép helyét megállapítani. A $Fix-2::Tn5$ mutáns $leu-4 - gly-1$, a $Fix-3$ és $Fix-4$ mutánsok a $pur-15 - str-1$, a $Fix-7$ mutáns a $leu-4 - trp-15$ kromoszómális régióba térképeződik. A $Nod-1 - Nod-3$ és a $Fix-5$ és $Fix-6$ mutánsok nem térképeződnek kromoszómára.
- Vizsgáltam a vad típusú baktérium - gazdanövény kapcsolat során a szimbiózis kialakulásához vezető lépéseket. Ennek alapján további csoportosítást végeztem a Nod^- mutánsokon.
- **Megállapítottam** a vad típusú Rhizobium meliloti 41 által indukált gümő fény- és elektronmikroszkópos szerkezetét, valamint összehasonlító vizsgálatokat végeztem a $Fix-2::Tn5$ mutánssal.



VIII. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. **Ausubel, F.M.** (1982): Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation.
Cell, 29, 1-2.
2. **Bánfalvi, Z.; Sakanyan, V.; Koncz, C.; Kiss, A.; Dusha, I. and Kondorosi, Á.** (1981): Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*.
Mol. Gen. Genet., 184, 334-339.
3. **Bedmar, E.J.; Olivares, J.** (1980): Autotransmissible resident plasmid of *Rhizobium meliloti*.
Mol.Gen.Genet., 177, 329-331.
4. **Berg, D.E.** (1977): Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5. p.205-212.
In: Bukhari, I.; Sharpio, J.A. and Adhya, S.L.(eds.) DNA insertion elements, plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
5. **Beringer, J.E.; Johnston, A.W.B.; Wells, B.** (1977): The isolation of conditional ineffective mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 98, 339-343.
6. **Beringer, J.E.; Hoggen, S.A.; Johnston, A.W.B.** (1978/a): Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R plasmid mediated recombination.
J. Gen. Microbiol., 104, 201-207.

-
7. **Beringer**, J.E.; Beynon, J.L.; Buchnan-Wollaston, A.V.; Johnston, A.W.B. (1978/b): Transfer of drug resistance transposon Tn5 to Rhizobium.
Nature (London), 276, 633-635.
 8. **Beringer**, J.E.; Brewin, N.J.; Johnston, A.W.B. (1980): The genetic analysis of Rhizobium in relation to symbiotic nitrogen fixation.
Heredity, 45, 161-186.
 9. **Brewin**, N.J.; Beringer, J.E.; Johnston, A.W.B. (1980): Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum.
J. Gen. Microbiol., 120, 413-420.
 10. **Buchanan-Wollaston**, A.V.; Beringer, J.E.; Brevin, N.J.; Hirsch, P.R.; Johnston A.W.B. (1980): Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium leguminosarum by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid.
Mol. Gen. Genet. 178, 185-190.
 11. **Casadeus**, J.; Olivares, J. (1979): Rough and fine linkage mapping of the Rhizobium meliloti chromosome.
Mol. Gen. Genet., 174, 203-209.
 12. **Cole**, M.A.; Elkan, G.H. (1973): Transmissible resistance to penicillin, neomycin and chloramphenicol in Rhizobium japonicum.
Antimicrob. Chemoter. Agents, 4, 248-253.

-
13. **Dénarié, J.**; Truchet, G.L.; Bergeron, G. (1976): Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*.
In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Ed. P.J.Nutman
Cambridge Univ. Press, 47-61.
 14. **Dusha, I.**; Schröder, J.; Putnoky, P.; Bánfalvi, Z.; Kondorosi, A. (1986): A cell-free system from *Rhizobium meliloti* to study the specific expression of nodulation genes.
Eur. J. Biochem., 160, 69-75.
 15. **Dusha, I.**; Kovalenko, S.; Bánfalvi, Z.; Kondorosi, A. (1987): *Rhizobium meliloti* insertion element ISRm2 and its use for the identification of the fix gene.
J. Bact., 169, 1403-1409.
 16. **Duncan, L.K.**; Tierney, A.B. (1973): Transformation of an R-factor from *Pseudomonas aeruginosa* into *Rhizobium trifolii*.
Mol. Gen. Genet., 126, 187-190.
 17. **Fähraeus, G.** (1957): The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique.
J. Gen. Microbiol., 16, 374-381.
 18. **Forrai, T.**; Vincze, E.; Bánfalvi, Z.; Kiss, G.B. Randhawa, G. S.; Kondorosi, A. (1983): Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*
J. Bact., 153/2, 635-643.
 19. **Fuehsmann** and Appleby (1979):
Biochim. Biophys. Acta 579, 314-324.

-
20. **Gábor-Hotchkiss, M.** (1972): Biological properties of Rhizobia and their information transfer system.
In: Ledoux, L. (Ed.): Uptake of informative molecules by living cells. North-Holland Publ. Co. Amsterdam. p. 212-241.
21. **Glenn, A.R.; Brewin, N.J.** (1981): Succinate-resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 126, 237-241.
22. **Govers, F.; Moerman, M.; Downie, J.,A.; Hooykaas, P.; Franssen, H.,J.; Louwerse, J.; vanKammen, A.; Bisseling, T.** (1986) *Rhizobium nod* genes are involved in including an early nodulin gene.
Nature (London), 323, 564-566.
23. **Göttfert, M.; Horváth, B.; Kondorosi, É.; Putnoky, P.; Rodriguez-Quinones, F.; Kondorosi, Á.** (1986): At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*.
J. Mol. Biol., 191, 411-420.
24. **Haas, D.; Holloway, B.W.** (1976): R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol.Gen.Genet., 144, 243-251.
25. **Higashi, S.** (1967): Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor.
J. Gen. Microbiol., 13, 391-403.

-
26. Hirsh, P.R. (1979): Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*.
J. Gen. Microbiol., 113, 219-228.
27. Hirsh, A.M.; Long, S.R.; Bang, M.; Haskins, N.; Ausubel, F.M. (1982): Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of *Rhizobium meliloti*
J. Bact., 151, 411-419.
28. Holliday, R. (1956): A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms.
Nature (London), 178, 987.
29. Holloway, B.W. (1978): Isolation and characterization of an R' plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bact., 133, 1078-1082.
30. Holloway, B.W. (1979): Plasmids that mobilize bacterial chromosome.
Plasmid, 2, 1-19.
31. Horváth, B.; Kondorosi, E.; John, M.; Schmidt, J.; Török, I.; Györgypál, Z.; Barabás, I.; Wieneke, U.; Schell, J.; Kondorosi, Á. (1986): Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa.
Cell, 46, 335-343.
32. Huber, J.D.; Parker, F.; Adland, G.F. (1968): A basic fuchsin and alkalized methylen blue rapid stain for epoxy embedded tissue.
Stain Technology, 43, 83.

-
33. **Juliot**, J.S.; Boistard, P. (1979): Use of RP4-prime plasmid constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*.
Mol. Gen. Genet., 173, 289-298.
34. **Keele**, B.B. Pat, J.R. Hamilton, B. Elkan, H.G. (1969): Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*.
J. Bact., 97/3., 1184-1191.
35. **Kiss**, G.B.; Vincze, É.; Kálmán, Z.; Forrai, T.; Kondorosi, Á. (1979): Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*.
J. Gen. Microbiol., 113: 105-118.
36. **Kiss**, G.B.; Dobó, K.; Dusha, I.; Breznovics, Á.; Orosz, L.; Vincze, É.; Kondorosi, Á. (1980): Isolation and characterization of an R-prime plasmid in *Rhizobium meliloti*.
J. Bact., 141, 121-128.
37. **Kiss**, G.B.; Kálmán, Z. (1981): Transformation of *Rhizobium meliloti* 41 with plasmid DNA.
J. Bact., 150/2, 465-470.
38. **Kiss**, G.B. (1986): A szimbiotikus nitrogénkötés fokozásának lehetőségei.
Növénytermelés, 35, 351-361.
39. **Kondorosi**, Á.; Barabás, I.; Sváb, Z.; Orosz, L.; Sik, T. and Hotchkiss, R.D. (1973): Evidence for common genetic determinants of nitrogenase and nitrate reductase in *Rhizobium meliloti*.
Nature (London), 246, 153-154.

-
40. Kondorosi, Á.; Sváb, Z.; Kiss, G.B.; Dixon R.A. (1977/a): Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*.
Mol. Gen. Genet., 151, 221-226.
41. Kondorosi, Á.; Kiss, G.B.; Forrai, T.; Vincze, É.; Bánfalvi, Z. (1977/b): Circular linkage map of *Rhizobium meliloti* chromosome.
Nature (London), 264, 525-527.
42. Kondorosi, Á.; Vincze, É.; Johnston, A.W.B.; Beringer, J.E. (1980): A comparison of three *Rhizobium* linkage maps.
Mol. Gen. Genet., 178, 403-408.
43. Kondorosi, Á.; Johnston, A.W.B. (1981): The genetics of *Rhizobium*.
Int. Rev. Cytol., 13(suppl), 191-224.
44. Kondorosi, Á.; Kondorosi, É.; Bánfalvi, Z.; Broughton, W.J.; Pankhurst, C.E.; Randhawa, G.S.; Wong, C.H. and Schell J. (1983/a): Analysis of symbiotic nitrogen fixation genes carried by the *Rhizobium meliloti* mega - plasmid
In: Molecular Genetics of the Bacteria-Plant interaction Ed.: A. Pühler. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
45. Kondorosi, Á.; Bánfalvi, Z.; Broughton, W.J.; Forrai T.; Kiss G. B.; Kondorosi, É.; Pankhurst, C.; Randhawa, G.S.; Sváb, Z.; Vincze, É. (1983/b): Localization and molecular genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*

-
- In: Structure and function of Plant Genomes. Edited by Orio Cifferi and Leon Dure III. Planum Publishing Corporation, 1983.
46. **Kondorosi, É.**; Bánfalvi, Z.; Kondorosi, Á. (1984): Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes
Mol. Gen. Genet., 193, 445-452.
 47. **Kondorosi, É.**; Kondorosi, Á. (1986): Nodule induction on plant roots by *Rhizobium*.
Trends in Biochem. Sci., 11, 296-299.
 48. **Lederberg, J.**; Lederberg, E.M. (1952): Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.
J. Bact., 63, 399.
 49. **Long, S.R.**; Buikema, W.J.; Ausubel, F.M. (1982): Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants.
Nature (London), 298, 485-488.
 50. **Maier, R.J.**; Brill, W.J. (1976): Ineffective and non nodulating mutant strains of *Rhizobium japonicum*.
J. Bact., 127, 763-769.
 51. **Malek, W.**; Kowalski, M. (1977/a): Structure of nodules induced by auxotrophic and ineffective mutants of *Rhizobium meliloti* strain L5-30 requiring cystein, arginin+uracil and histidin.
Acta Microbiol.Pol., 26, 351-359.

-
52. **Malek, W.;** Kowalski, M. (1977/b): Auxotrophic mutations related to symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* strain L5-30.
Acta Microbiol. Pol., 26, 345-350.
53. **Martinez, D.D.;** Arias, A. (1972): Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups
J. Bact., 109/1, 467-470.
54. **Meade, M.H.;** Signer, E.R. (1977): Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 2076-2078.
55. **Meade, M.H.;** Long, S.R.; Ruvkun, G.B.; Brown, S.E. and Ausubel, F.M. (1982): Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis.
J. Bact., 149, 114-122.
56. **Newcomb, W.;** Syono, K.; Torrey, J.G. (1977): Development of an ineffective pea root nodule: morphogenesis, fine structure, and cytokinin biosynthesis.
Can. J. Bot., 55, 1891-1907.
57. **Nuti, M.P.;** Lepidi, A.A.; Prakash, R.K.; Schilperoort, R.A. and Cannon, F.C. (1979): Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids.
Nature (London), 282, 533-535.

-
58. **Nutman, P.S.** (1971): The modified Fahraeus slide technic.
In: Vincent, J.M. (Ed.) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific, Oxford. page 144-145.
59. **Orosz, L.; Sváb, Z.; Kondorosi, Á. and Sik, T.** (1973): Genetic studies on Rhizobiophage 16-3. Genes and functions on the chromosome.
Mol. Gen. Genet., 125, 341-350.
60. **Pankhurst, C.E.; Schwinghamer, E.A.; Bergersen, F.J.** (1972): The structure and acetylen-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of *Rhizobium trifolii*
J. Gen. Microbiol., 70, 161-177.
61. **Patel, J.J.; Yang, A.F.** (1980): Light and electron microscope studies of nodule structure of alfalfa
Can. J. Microbiol., 27, 36-43.
62. **Planqué, K.; Kennedy, I.R.; de Vries G.E.; Quispel, A.; van Brussel, A.A.N.** (1977): Location of nitrogenase and ammonia assimilatory enzymes in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* and *R. lupini*
J. Gen. Microbiol., 102, 95-104.
63. **Prakash, R.K.; Schilperoort, R.A. and Nuti, M.P.** (1981): Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (*nif*) genes.
J. Bact., 145, 1129-1136.

-
64. **Putnoky, P.**; Kondorosi, Á. (1986): Two gene clusters of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency.
J. Bact., 167/3, 881-887.
65. **Putnoky, P.**; Grosskopf, E.; Cam Ha, D. T.; Kiss, G. B.; Kondorosi Á. (1988): *Rhizobium* fix genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development.
J. Cell Biol., 106. (in press).
66. **Rosenberg, C.**; Boistard, P.; Dénarié, J. (1981): Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*.
Mol.Gen.Genet., 184, 326-333.
67. **Rostás, K.**; Kondorosi, E.; Horváth, B.; Simontcsits, A.; Kondorosi, Á. (1986): Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1757-1761.
68. **Ruvkun, G.B.** and Ausubel, F.M. (1980): Interspecies homology of nitrogenase genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 191-195.
69. **Ruvkun, G.B.** and Ausubel, F.M. (1981): A general method for site directed mutagenesis in prokaryotes.
Nature (London), 289, 85-88.
70. **Scherrer, A.**; Dénarié, J. (1971): Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* and of their prototrophic revertants.
Plant and Soil, Special Volume, 39-45.

-
71. **Schwinghamer**, E.A. (1968): Mutation to auxotrophy and prototrophy as related to symbiotic effectiveness in *Rhizobium leguminosarum* and *R. trifolii*.
Can. J. Microbiol., 15, 611-622.
72. **Schwinghamer**, E.A. (1964): Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp.
Can. J. Microbiol., 10, 221-233
73. **Sik**, T.; Horváth, J.; Chatterjee, S. (1980): Generalized transduction in *Rhizobium meliloti*
Mol. Gen. Genet., 178, 511-516.
74. **Sváb**, Z.; Kondorosi, A.; Orosz, L. (1978): Specialized transduction of cysteine marker by *Rhizobium meliloti* phage 16-3.
J. Gen. Microbiol., 106, 321-327.
75. **Török**, I. and Kondorosi, Á. (1981): Nucleotid sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene.
Nucleic Acids Res. 9, 5711-5723.
76. **Truchet**, G.L.; Dénarié, J. (1973): Structure et activité reductrice d'acetylene des nodules de luzerne (*Medicago sativa* L.) induits par des mutants de *Rhizobium meliloti* auxotrophes pour l'adenine et pour l'uracile.
C. R. Hébd. Séances Acad. Sci., Ser.D., 277, 841-844.
77. **Truchet**, G.L.; Dazzo, F.B. (1982): Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen.
Planta, 154, 352-360

-
78. **Tu, J.C.** (1977): Structural organization of the rhizobial root nodules of alfalfa.
Can. J. Bot., 55, 35-42.
79. **Ucker, D.S.; Signer, R.E.** (1978): Catabolite-repression-like phenomenon in *Rhizobium meliloti*
J. Bact., 136/3, 1197-1200.
80. **Vincze, É.** (1981): Doktori disszertáció.
MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet.
81. **Vincze, É.; Koncz, C.; Kondorosi, Á.** (1981): Construction in vitro of R-prime plasmids and their use for transfer of chromosomal genes and plasmids of *Rhizobium meliloti*
Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 32 (3-4), 195-204.
82. **Vincent, J.M.** (1980): Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. page 103-129.
In: Newton, W.E. and Orme-Johnston, W.H. (Ed.): Nitrogen fixation, vol.2. University Park Press, Baltimore.
83. **Wu, T.T.** (1966): A model for three point analysis of random general transduction.
Genetics, 54, 405-410.
84. **Zelezna-Kowalska, I.** (1977): Correlation between streptomycin resistance and symbiotic properties of *Rhizobium*.
Acta Microbiol. Pol., 26, 233-241
85. **Zelezna-Kowalska, I.; Kowalski, M.;** (1978): Restoration of effectiveness of *R. meliloti* ineffective mutants by transduction of high level streptomycin resistance
Acta Microbiol. Pol., 27, 339-345.

86. Zurkowski, W.; Lorkiewicz, Z. (1978): Effective method for the isolation of non - nodulating mutants of *Rhizobium trifolii*.

Genet. Res., (Cambridge), 32, 311-314.

A dolgozat gépelése, szerkesztése és sokszorosítása TISZATEXT (Vizawrite) szövegszerkesztővel Commodore-64 számítógépen ROBOTRON S6120 írógéppel készült.