

SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉSÉRT FELELŐS GÉNEK

LOKALIZÁLÁSA *RHIZOBIUM MELILOTIBAN*

Írta:

Bánfalvi Zsófia

Doktori disszertáció

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

S Z E G E D

1 9 8 2.



Doktori disszertációm az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készítettem. Köszönettel tartozom Dr. Alföldi Lajos igazgató urnak, hogy lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez. Köszönetet mondok kutatócsoportunk vezetőjének, Dr. Kondorosi Ádámnak, aki sokoldalú, értékes, elméleti és gyakorlati tanácsaival mindvégig támogatta és segítette munkámat.

Dolgozatom és kísérleteim egy csoportmunka részét képezik. Kísérleteim kiindulópontját munkatársaim, Dr. Dusha Ilona, Forrai Tamás, Dr. Kiss György Botond, Dr. Sváb Zóra és Dr. Vincze Éva eredményei jelentették. Köszönettel tartozom két külföldi munkatársamnak Vehary Sakanyannak és Gursharan Randhawanak, akik munkájával kísérleteim egy része szoros kapcsolatban állt, valamint Dr. Kiss Antalnak, a Biokémiai Intézet munkatársának, a DNS - DNS hibridizációs technika elsajátításában nyújtott segítségéért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kondorosi Ádámnak és Dr. Kiss György Botondnak a dolgozat megírásával kapcsolatos hasznos tanácsaikért.



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
I. BEVEZETÉS	1.
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2.
1. A <i>Rhizobium</i> ok genetikai vizsgálata	2.
2. A nitrogénkötésben szerepet játszó gének	8.
3. <i>Rhizobium</i> plazmidok	15.
III. CÉLKITŰZÉS	19.
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20.
1. A dolgozatban szereplő genetikai markerek	20.
2. Baktérium törzsek és plazmidok	21.
3. Táptalajok és higitók	24.
4. A baktériumok szaporítása és el-tartása	25.
5. A mutánsok előállítása	26.
6. Konjugáció, genetikai térképezés	27.
7. Növényi teszt	29.
8. Agaróz gélelektroforézis	30.
9. DNS-ek kimutatása és izolálása	30.
10. DNS-ek emésztése restrikciós enzi-mekkel	32.
11. DNS - DNS hibridizáció	32.
V. EREDMÉNYEK	34.
1. Két nagy molekulásulyu plazmid kimuta-tása a <i>Rhizobium meliloti</i> 41-ben	34.

2. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás <i>R.meliloti</i> 41 mutánsok izolálása	35.
3. A hőkezelésből származó Nod ⁻ mután- sok genetikai analizise	38.
4. <u>Nod</u> , <u>nif</u> gének lokalizálása a pRme41b plazmidra	43.
5. A Tn5 inszerció helyének lokalizálása a transzpozíciós mutagenézisből származó szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mu- tánsokban	49.
VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	52.
1. Két nagy molekulásulyu plazmid a <i>R.meliloti</i> 41-ben	52.
2. <u>Nod</u> és <u>nif</u> gének lokalizálhatók a pRme41b plazmidra	53.
3. Hőkezeléssel a <i>R.meliloti</i> 41-ből szimbi- ózisban hibás, deléciós mutánssorozat állítható elő	54.
4. A <i>R.meliloti</i> 41 <u>nod-nif</u> régiójának instabilitása	57.
5. A Tn5-tel jelölt szimbiotikus nitrogénkő- tésben hibás mutánsok jellemzése	58.
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	61.
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	62.

I. BEVEZETÉS

A biológiai nitrogénkötés az a folyamat, amely során a levegő dinitrogénje élő szervezetek közreműködésével ammóniává redukálódik. A dinitrogén redukcióját egy enzimrendszer, a nitrogenáz-nitrogenáz reduktáz komplex végzi.

Nitrogén fixációra csak egyes prokarióta szervezetek képesek. Ezek a nitrogénkötés formája alapján alapvetően két típusba sorolhatók: a szabadon élve nitrogénkötésre képes szervezetekre és a szimbiotikus nitrogénkötő organizmusokra.

A szimbiotikus nitrogénkötő mikroorganizmusok egyik csoportját a *Rhizobium*ok alkotják. Gazdanövényeik pillangós virágú növények. A baktérium által megkötött nitrogén egyrészt közvetlenül a gazdanövény nitrogénutánpótlását biztosítja, másrészt növeli a talaj nitrogéntartalmát. Ezért a nitrogénkötés folyamatának megismerése nemcsak elméleti, de gazdasági szempontból is igen jelentős.

Munkacsoportunk célja a *R.meliloti* és gazdanövénye, a lucerna között kialakuló szimbiotikus nitrogénkötés folyamatának molekuláris szinten való megismerése. Ehhez korábbi kísérleteinkkel létrehoztuk a *R.meliloti* vizsgálatára alkalmas genetikai rendszert. Jelenlegi kísérleteink elsősorban a szimbiózis kialakításáért felelős gének és azok szabályozásának megismerésére irányulnak. Ennek a kísérletsorozatnak egyik része a szimbiotikus nitrogénkötésért felelős gének lokalizálása.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A *Rhizobium*ok genetikai vizsgálata

A baktériumok genetikai vizsgálatához szükség van nagyszámú mutáns előállítására és génátviteli rendszer kidolgozására.

1.1. Mutagenézis

1.1.1. Kémiai mutagenézis

*Rhizobium*oknál hatásos mutagénnek bizonyult vegyületek: az etil-metán-szulfonát, salétromossav, nitrozoguanidin /NTG/. Ezekkel számos *Rhizobium* fajban állítottak elő auxotróf /Meade és mtsai., 1977; Kondorosi és mtsai., 1977; Beringer és mtsai., 1978/ és szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokat /Maier és Brill, 1976. - *R. japonicum*ból; Beringer és mtsai., 1977. - *R. leguminosarum*ból; Forrai és mtsai., 1982. - *R. meliloti*ból/.

1.1.2. Transzpozíciós mutagenézis

Előnye: a transzpozonok antibiotikum rezisztenciájuk által közvetlenül szelektálható fenotípusu markerekkel jelölik meg a gént, amelybe beépülnek. Fizikai módszerekkel /restrikciós enzimekkel történő térképezéssel, hibridizációval, heteroduplex analizissel/ is felismerhetők. Ezáltal hagyományos genetikai technikákkal nem térképezhető gének lokalizálását is lehetővé teszik.

A transzpozíciós mutagenézis módjai *Rhizobium*okban:

1. "Suicide" plazmidok használata. A transzpozon bevittele egy olyan vektorplazmiddal történik, amely nem képes fennmaradni a recipiensben. A genomba inszertálódott transzpozont hordozó mutánsok a transzpozon antibiotikum rezisztenciájára szelektálva közvetlenül izolálhatók /Boucher és mtsai., 1977; Van Vliet és mtsai., 1978; Beringer és mtsai., 1978/.

A pJB4JI plazmid /Beringer és mtsai., 1978/ a pPH1JI plazmid Mu fágot és Tn5 transzpozont hordozó származéka. A Mu fág DNS jelenléte miatt a plazmid alkalmas a *Rhizobium*ok mutagenézisére, mind auxotróf /*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli* az auxotróf megjelenési gyakorisága: 0,5%/, mind szimbiózisban hibás mutánsok előállítására /Pl.: *R. meliloti* 2011-ből Long és mtsai., 1981; *R. meliloti* 41-ből Forrai és mtsai., 1982/.

2. Helyspecifikus mutagenézis. Egy-egy már izolált génszakasz részletes genetikai vizsgálatát teszi lehetővé. Fő lépései a következők :

1. Megfelelő vektor DNS-be klónozott *Rhizobium* DNS fragment transzpozíciós mutagenézise.
2. A mutagenizált plazmid bevitele *Rhizobiumba*.
3. A mutagenizált régió beépülése a genomba homológ rekombinációval, ami hibás gén-funkciót, azaz mutáns fenotípust eredményez /Ruvkun és Ausubel, 1981/.

1.1.3. Plazmideliminálás

A *Rhizobium*ok a kromoszómális DNS-en kívül cirkuláris DNS formájában endogén plazmidot, illetve plazmidokat is hordoznak /lásd: II.3. sz. fejezet/. Ezért az általuk kódolt funkciókban hibás fenotípusú mutánsok plazmideliminálási módszerekkel is előállíthatók.

Hőkezeléssel a *R.trifolii*ből a baktérium log. fázisig felnevesztett folyadék tenyészetének a *R.trifolii* számára magas, 35°C-on való tartásával, törzstől függően változó, 1-75%-os gyakorisággal gümőképzésben hibás, Nod⁻ mutánsok izolálhatók /Zurkowski és Lorkiewicz, 1978/.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei bizonyították, hogy hőkezeléssel a különböző R plazmidok /R68.45, RP4, RP41/ 30-90%-os gyakorisággal törölhetők az *R.meliloti* 41-ből. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás, elsősorban Nod⁻ mutánsok izolálására is végeztünk hőkezeléses kísérleteket. Ennek eredményeként kaptunk néhány olyan, a vad típusától eltérő, nyálkás és transzlucens fenotípusú baktérium telepet, amelyek elvesztették gümőkötő képességüket.

1.2. Génátvitel konjugációval

A *Rhizobium*okban a génátvitel mindhárom formája, transzformáció, transzdukció, konjugáció, ismert. Ezek közül a genetikai térkép készítésére a konjugációs rendszer bizonyult a legalkalmasabbnak.

1.2.1. Kromoszóma mobilizáció, R68.45

Kromoszómális gének konjugációs térképezéséhez kromoszó-



ma mobilizációra képes /Cma⁺/ plazmid szükséges.

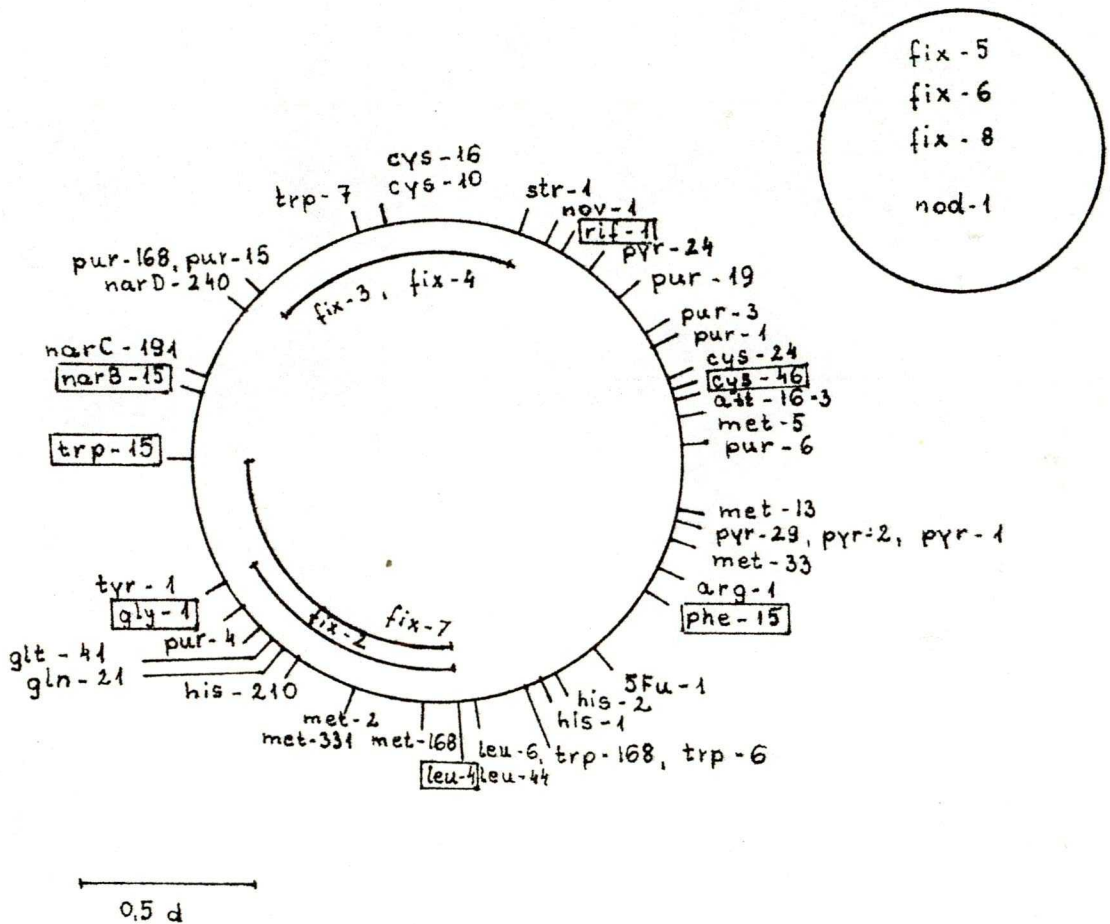
A *Rhizobium*ok kromoszómájának térképezésére legáltalánosabban használt plazmid a Haas és Holloway /1976/ által izolált R68.45. A széles gazdaspecifitású plazmid a *Pseudomonas aeruginosa* PAO törzséből származik, Cma⁺ tulajdonságát az inszerciós /IS/ elemekhez hasonló szerkezetű /Leemans és mtsai., 1980/ 1,2 Md-nyi extra-DNS szakasz biztosítja /Jacob és mtsai., 1977/. A plazmid a kromoszóma szinte bármely pontjáról képes 10^{-3} - 10^{-5} gyakorisággal transzfert indítani, nagy génszakaszok átvitelére képes /a *R.meliloti* kromoszómájának 30%-ra is/, és ezáltal aránylag gyors térképezést tesz lehetővé.

1.2.2. A *R.meliloti* 41 kromoszóma térképének megszerkesztése

Az R68.45 plazmid segítségével készítette el munkacsoportunk a *R.meliloti* 41 kromoszómájának kör alakú genetikai térképét /Kondorosi és mtsai., 1977/.

A térképezésnél többszörösen auxotróf recipienseket használtunk. Egy marker átvitelére szelektáltunk, majd megállapítottuk a nem szelektált fenotípusú marker/ek/ átjutási gyakoriságát, azaz kapcsoltságát a szelektált markerhez. Két gén távolságát /d/ a Wu /1966/ által a transzdukáló fágokra leírt képlet módosításával a $d = 1 - \sqrt[3]{c}$ alapján számítottuk a kísérletileg meghatározott kapcsoltsági /c/ értékekből. Az így elkészített *R.meliloti* 41 kromoszóma térképünk jelenleg 44 auxotrófia és antibiotikum rezisztencia markert tartalmaz /1. ábra/.

1. ábra A *R. meliloti* 41 kromoszóma térképe



A kromoszómára nem lokalizálható mutációkat egy külön körben tüntettem fel.

A markerek közti távolság "d" értékben van kifejezve.

A gyorstérképezéshez használt markereket bekeretezéssel jelöltem.

1.2.3. Gyorstérképezési módszer közvetlenül nem szelektálható fenotípusú mutációk térképezésére

A szimbiotikus nitrogénkötésben hibás fenotípust eredményező mutációk közvetlenül nem szelektálható fenotípusú markereket jelentenek. Lokalizálásukra egy speciális, gyorstérképezésre alkalmas módszert dolgoztunk ki. Ehhez először egy egymással kapcsoltságot mutató auxotrófia markerekből álló recipiens sorozatot állítottunk elő /lásd: 1. ábra/. Az R68.45 plazmival a térképezendő mutáns teljes kromoszómáját prototróf rekombinánsokra szelektálva 8 fragment formájában visszük át a recipiensekbe. Az így izolált rekombinánsok utólagos vizsgálatával állapítjuk meg, melyik rekombináns kategóriában jelenik meg a térképezendő mutáns fenotípus /Vincze, 1981/.

Mivel a *R. meliloti*-ban a többszörös crossing overek gyakorisága alacsony, a módszer megbízható eredményt ad, mint ahogy ezt az ismert térképhelyzetű mutációk /pur-1, pyr-24, his-1, 5FU-1/ vizsgálata is bizonyította /Vincze, 1981/.

A gyorstérképezési módszer segítségével 4 NTG mutagenézissel és 3 Tn5 transzpozícióval izolált Fix^- mutánsról megállapítottuk, hogy közülük kettőben a mutáció helye a pur-15 - str-1 régióban, másik kettőben a leu-4 - gly-1, illetve a leu-4 - trp-15 markerek között található, míg a többi három mutánsban nem lokalizálható a kromoszómára. A megvizsgált egy nod⁻ mutáció szintén nem térképeződött a kromoszómára. A gyorstérképezéssel kapott eredmények tehát egyes fix és nod gének extrakromoszómális elhelyezkedésére utaltak /Forrai és mtsai., 1982/ /1. ábra/.

1.2.4. Különböző *Rhizobium* törzsek közti homológia

Jelenleg négy *Rhizobium* törzs kromoszóma térképe ismert. A *R. meliloti* 41-en kívül a *R. meliloti* GR4-é /Casadesus és Olivares, 1979/, a *R. leguminosarum* 300-é /Berlinger és mtsai., 1978/, ugyancsak az R68.45, míg a *R. meliloti* 2011-é /Meade és Signer, 1977/ az RP4 plazmid segítségével készült.

Interspecifikus keresztezésekkel megállapítható volt, hogy a *R. leguminosarum*, *R. trifolii* és *R. phaseoli* törzsek között fajon belüli értékekhez hasonló gyakorisággal nyerhetők haploid rekombinánsok, tehát ezek kromoszómái közel homológoknak tekinthetők /Johnston és Berlinger, 1977/. A *R. meliloti* és *R. leguminosarum* esetében igen alacsony gyakorisággal és csak egyes kromoszómális régiókban /pl.: str-1 - rif-1/ izolálhatók haploid rekombinánsok /Johnston és mtsai., 1978/. A két kromoszóma térkép összehasonlítása alapján azonban a génelrendeződés szempontjából ezek a törzsek is nagyfokú hasonlóságot mutatnak /Kondorosi és mtsai., 1980/.

2. A nitrogénkötésben szerepet játszó gének

2.1. A szimbiózis kialakításáért felelős gének

A szimbiózis kialakulása a növény és baktérium által egyaránt meghatározott, bonyolult, több lépéses folyamat.

Az egyes *Rhizobium* törzsek csak meghatározott növényfajokkal képesek szimbiózisos kapcsolat kialakítására. A gazdaspecifitás jelenségének magyarázatában a növényi lek-

tineknek /glikoproteinek/ és a baktérium felületén lévő speciális szénhidrát strukturáknak /receptoroknak/ tulajdonítanak nagy jelentőséget, amelyek az antigén-antitesthez hasonlóan felismerik egymást és nem kovalens, reverzibilis kötődéssel egymáshoz kapcsolódnak. Ez a kapcsolat a szimbiózis kialakulásának feltétele és egyben egyik kezdeti lépése is /Bhuvanewari és mtsai., 1977; Bhuvanewari és Bauer, 1978/.

A gyökér közelében elszaporodott és a gyökér felületéhez kötődött baktériumok hatására a hajszálgökerek elágazódnak, meggörbülnek, kialakul az infekciós fonál, megindul a gümő képződése és differenciációja. A baktériumok kiszabadulva az infekciós fonálból átalakulnak bakteroidokká. A nitrogén ammóniává történő redukálása a bakteroidokban történik.

A szimbiózis kialakulása tehát egy több lépésből álló folyamat, az ebben résztvevő gének azonban alapvetően két csoportba sorolhatók : a gümőképzésben /noduláció/ és a nitrogénkötésben /fixáció/ szerepet játszó génekre.

2.2. A_nitrogenáz

A nitrogenáz a nitrogén ammóniává redukálását katalizáló enzim. A nitrogenáz enzim szintéziséhez szükséges információt a baktériumok hordozzák.

A különböző mikroorganizmusokból izolált nitrogenáz enzimek igen nagy szerkezeti hasonlóságot mutatnak /Eady és Postgate, 1974/.

A szabadon élve nitrogénkötésre képes baktériumok /pl.: *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii*/ nitrogenáz enzime két fő komponensből áll. Az I-es komponens négy alegysége $\alpha_2\beta_2$ 2 Mo-t és 28-34 nem hem vasat tartalmaz, 200-250 ezer molekulasúlyu, ez végzi a N_2 redukcióját. A II-es komponens két monomerből épül fel α_2 4 Fe atomot tartalmaz, 55-65 ezer molekulasúlyu. Ez szolgáltatja az I-es komponens működéséhez szükséges elektronokat /nitrogenáz reduktáz/ /Eady és Postgate, 1974; Kennedy és mtsai., 1976/.

Az enzim működéséhez ATP, redukáló kapacitás e^- , és alacsony oxigén szint szükséges. A nitrogenáz hidrogénfejlődést is katalizál /Fisher és Brill, 1969/. A hidrogén fejlődéshez elhasznált elektronok reciklizálására képes enzim az "uptake" hidrogenáz /Dixon, 1972/. A hidrogenáz működése fokozza a nitrogénkötés effektivitását /Shubert és Evans, 1976/.

2.3. A nif gének szerkezete és klónozása

A nitrogenáz enzim szintéziséért felelős gének a nif gének.

A szabadon élve nitrogénkötésre képes *K.pneumoniae*-ban a nif gének a kromoszómára, a hisztidin bioszintézisében szerepet játszó génszakaszhoz lokalizálhatók /Streicher és mtsai., 1972/.

A nif gének átvitele *K.pneumoniae*ből *E.coliba*, *Salmonellaba* konjugatív plazmidok segítségével történt.

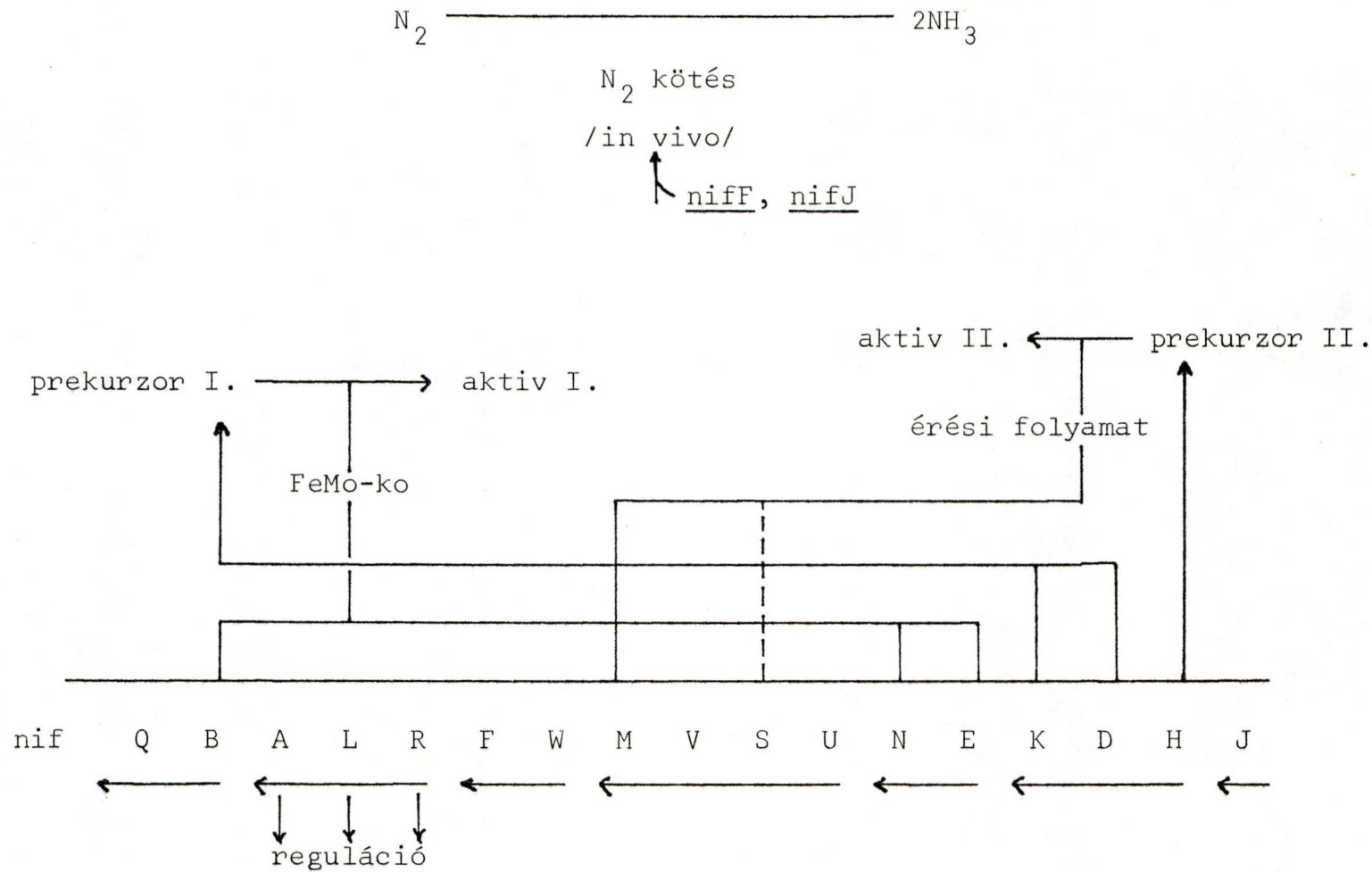
Az így átvitt nif gének az eredetileg nem nitrogénkötő baktériumokban is funkcióképes enzimet eredményeztek /Dixon és Postgate, 1972; Postgate és Krisnapillai, 1977/. A konjugatív nif plazmidok közül kiemelt jelentősége van a pRD1-nek /Dixon és mtsai., 1976/, amely a teljes his-nif régiót széles gazdaspecifitású vektoron hordozza és ezáltal lehetővé teszi ennek a géncsoportnak bevitelét szinte bármelyik Gram-negatív baktériumba.

A nif régióinak, illetve egyes szakaszainak génsebészeti technikákkal történő átvitele amplifikálható kis molekulású klónozó vektorokba /Cannon és mtsai., 1977; 1979; Riedel és mtsai., 1979/ lehetőséget adott a nif régió részletes fizikai térképezésére, helyspecifikus mutagenézisére, a pontos génsorrend, a transzkripció egységei, a nif expresszió szabályozásának megállapítására.

Ezáltal vált ismertté, hogy a *K.pneumoniae* nif régiója 24 kb-nyi folytonos DNS szakasz, amelyen belül 7 transzkripció egység és 17 gén különíthető el /MacNeil és mtsai., 1978; ManNeil és Brill, 1980/. Ezek közül a nitrogénáz enzim I. komponensének strukturgénjei a nifKD, a II. komponensé a nifH /2. ábra/. A strukturgéneket hordozó pACYC184 származék a pSA30 plazmid, amelyet Cannon és munkatársai /1979/ állítottak elő.



2. ábra A *K.pneumoniae* nif génjeinek sorrendje, transzkripció egységei és funkciója /Brill, 1980/



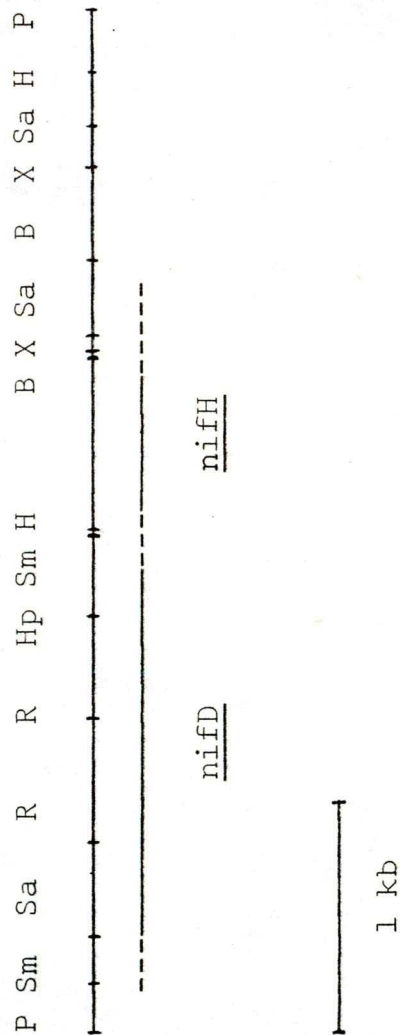
A *K.pneumoniae* nifD és H génjei DNS-DNS hibridizációval homológiát mutatnak más nitrogénkötő mikroorganizmusok, köztük a *Rhizobiumok* nif génjeivel /Ruvkun és Ausubel, 1980/. Ez a felismerés adta meg a lehetőséget az egyébként csak szimbiózis során megnyilvánuló és így klasszikus genetikai módszerekkel nehezen tanulmányozható *Rhizobium* nif gének génsebészeti technikákkal történő lokalizálására és klónozására.

A *R.meliloti* 2011 nif régiójának 6 EcoRI fragmentjét hordozó plazmidot, a pRmR1-et, majd ennek származékait a *K.pneumoniae* nifDH génjeivel homológ 3,9 kb-nyi /pRmR2/ és az evvel szomszédos 5 kb-os DNS szakaszt hordozó pRmR3-at Ruvkun és Ausubel /1980/ állították elő.

A *R.meliloti* 41-ből a klónozást Koncz Csaba végezte úgy, hogy a *R.meliloti* 41 extrakromoszómális DNS-ének részleges emésztéséből származó PstI fragmenteket épített be a pHc79-es cosmid vektorba. 410 rekombináns klón közül kettő mutatott hibridizációt a pSA30 plazmiddal. Ezek közül a további kísérletekhez a pKJ243 jelűt használtuk. Vehary Sakanyan megállapította, hogy a pKJ243-nak csak egy 4,8 kb-nyi PstI fragmentje tartalmazza a *K.pneumoniae*val homológ nif régiót. A *Rhizobium* nif génjeinek részletes vizsgálatához ezért ezt a szakaszt újra klónoztuk egy másik vektor DNS-be, a pBR322-be /Dusha Ilona/. Ennek eredményeként kaptuk a pID1-es plazmidot, amelyről Kiss Antal a pSA30-ból származó szubfragmentekkel hibridizáltatva kimutatta, hogy egy ~ 0,7 kb-nyi szakasza a *K.pneumoniae* nifH, és egy

~ 2 kb-nyi pedig a nifD génjével homológ /3. ábra/. Az így előállított pKJ243 és pID1 plazmidokat használtam a dolgozatban szereplő kísérletekhez is.

3. ábra A *R.meliloti* 41 nif régiója /Bánfalvi és mtsai., 1981/



Rövidítések: P - PstI; Sm - SmaI; Sa - Sall; R - EcoRI; Hp - HpaI; H - HindIII; B - BglII; X - XhoI

3. Rhizobium plazmidok

A *Rhizobium*ok genetikai információjának 5-20%-át plazmidok hordozzák. A plazmidok száma és mérete a különböző *Rhizobium*fajokban, sőt még ugyanazon faj geográfiailag eltérő helyről származó variánsaiban, törzseiben is eltérő /1. táblázat/.

1. táblázat Néhány gyorsan növő *Rhizobium* törzsben kimutatható endogén plazmidok /Prakash és mtsai., 1980; 1981; Rosenberg és mtsai., 1981; adatai alapján/

Törzs	Plazmid neve	Plazmid mérete /Md/
<i>R. leguminosarum</i> 1001 300	pRle1001a b	150 > 250
	pRle300a b c	100 165 205
<i>R. trifolii</i> 0403	pRtr5a b	> 180 > 300
	pRtr0403	> 250
<i>R. phaseoli</i> 3622	pRph3622a b	100 > 250
<i>R. meliloti</i> L5-30 V7 Rf22 RCR2011	pRmeL5-30a b	90 > 300
	pRmeV7a b	~ 160 > 300
	pRmeRfa b c	90 120 > 300
	pRmeRCR2011	> 300

A *Rhizobium* plazmidok által hordozott genetikai információk közül csak néhány és ez is elsősorban a *R. leguminosarum* törzsek esetében ismert. Ezek a következők :

1. Bakteriocin termelés. A *R. leguminosarum* törzsekben Hirsch /1979/ transzferábilis, közepes szintű bakteriocin termelésre képes plazmidokat mutatott ki /pRL1JI, pRL3JI, pRL4JI/. A különböző plazmidok által termelt bakteriocinok hasonlóak, DNS szekvenciájuknak ez a szakasza homológ /Brewin és mtsai., 1980/.

2. Alacsony szintű bakteriocin termelés represszálása.

A *R. leguminosarum* 300 alacsony szintű bakteriocin termelésére képes. A pRL1JI, pRL3JI, pRL5JI plazmidok átvihetők ebbe a törzsbé, közepes bakteriocin termelő képességük megnyilvánul, míg a törzs saját bakteriocin termelésének gátlását idézik elő /Johnston és mtsai., 1978/.

3. Gümőképzés. A *R. leguminosarum* A171 törzs legkisebb plazmidjának eliminálása egyúttjárt a törzs nodulációs képességének elvesztésével /Casse és mtsai., 1979/, akárcsak a *R. trifolii* esetében, ahol a hőkezelés, mint plazmidkurálási eljárás nagy százalékban Nod⁻ mutánsokat eredményezett /Zurkowski és Lorkiewicz, 1978/. A gümőképzés a *R. leguminosarum* esetében más *R. leguminosarum* törzsből származó plazmidok, pl.: a pRL1JI bevite-
lével helyreállítható /Johnston és mtsai., 1978/.

4. Gazdaspecifitást meghatározó gének. A *R. leguminosarum* plazmidok átvihetők más *Rhizobium* törzsekbe is. A *R. leguminosarum* plazmidot hordozó *R. trifolii* és *R. phaseoli* transzkonjugánsok eredeti gazdanövényükön kívül a borsón is gümőt képeznek, ami arra utal, hogy számos nodulációért felelős gén mellett a gazdaspecifitást meghatározó gének is plazmidon találhatóak /Johnston és mtsai., 1978/.

5. Nitrogénkötés. A *R. leguminosarum* 248-ban a pRL1JI, a 300-as törzsben pedig a 205 Md-os plazmidra lokalizálhatók a nod géneken kívül fix gének is. Erre utal többek között az a kísérleti eredmény is, hogy a 300-as törzs egyik deléciós Nod⁻ mutánsában a pRL1JI plazmid egyes mutagenizált származékainak bevitele után Fix⁻ transzkonjugánsokat lehetett kimutatni /Buchanan-Wollaston és mtsai., 1980/. A *K. pneumoniae* nifKDH génjeivel végzett hibridizációs kísérlet alapján a *R. leguminosarum*-ban a nitrogenáz enzim strukturgénjeit kódoló DNS szakasz plazmidon található /Nuti és mtsai., 1979/.

Prakash és munkatársai /1980/ több *Rhizobium* törzs plazmid DNS-ét ugyancsak a *K. pneumoniae* nif strukturgénjeivel hibridizáltatva nif géneket a pR1e1001a, pRph3622b, pRtr5a és a pRtr0403 plazmidokon /1. táblázat/ találtak.

A *R. meliloti* 2011-ben és az L5-30-ban a nif gének a törzs > 300 Md-os plazmidjára lokalizálhatók /Rosenberg és mtsai., 1981/, akárcsak a többi 16 *R. meliloti* törzsben, ahol hasonló méretű plazmidot lehetett kimutatni. Mivel az L5-30-as törzs

spontán Nod^- mutánsaiban a nifDH gének is elvesztek, feltételezhetően ezek a plazmidok még más, a szimbiózis kialakításában szerepet játszó géncsoportokat is hordoznak. Erre utal a plazmidok legújabb közös elnevezése is : "Sym-plazmidok" /pSym/.

6. Sejtfal poliszaharidok. Pl.: *R. leguminosarum*ban plazmidvesztés hatására megváltozik a telepek morfológiája /Prakash és mtsai., 1980/.

7. Pigment termelés. *R. phaseoliban* a pigment termelés és a nodulációs képesség azonos plazmidra lokalizálható /Beynon és mtsai., 1980/.

8. Transzfer képesség. A *R. leguminosarum* plazmidok genetikai vizsgálatát nagyban elősegítette transzferképességük felismerése. A pRL plazmidok konjugatívak, de változó transzfergyakoriságot mutatnak / 10^{-2} - 10^{-6} /, /Hirsch, 1979; Brewin és mtsai., 1980/.

A *R. meliloti* törzsek esetében csak a *R. meliloti* GR4 és 11 törzsek esetében ismert, hogy tartalmaznak konjugatív endogén plazmidot /pEZ1/ /Bedmar és Olivares, 1980/.

9. Inkompatibilitás. A pRL plazmidok azonos inkompatibilitási csoportba tartoznak /Brewin és mtsai., 1980/, de eltérők pl.: a 300-as törzs plazmidjaitól és más *Rhizobium* fajokétól.

III. CÉLKITÜZÉS

A szimbiózis kialakításáért felelős gének genetikai vizsgálatának egyik lépése a gének lokalizálása a baktériumban.

Munkacsoportunknak a *R.meliloti* 41 Fix⁻ és Nod⁻ pontmutánsaival végzett korábbi genetikai térképezési eredményei egyes fix és nod gének extrakromoszómális elhelyezkedésére utaltak /lásd: II. fejezet, 1.2.3. pontja/. Mivel kimutattuk, hogy a *R.meliloti* 41 két endogén plazmidot is tartalmaz /lásd: V.1. fejezet/, feltételezhetjük, hogy egyikük, vagy esetleg mindegyikük hordoz szimbiózisban szerepet játszó géneket. Ezt a feltételezést a következő kísérletekkel akartam igazolni :

1. A nif gének lokalizálása DNS - DNS hibridizációs kísérletekkel a klónozott *R.meliloti* 41 nif gének segítségével.
2. Plazmid törlésre alkalmas eljárással /hőkezeléssel/ szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálása. A mutáció helyének lokalizálása, összefüggés keresése a mutáns fenotípus és a *R.meliloti* 41 valamelyik endogén plazmidjának elvesztése között.
3. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálása transzpozíciós mutagenézissel. A transzpozon beépülési helyének lokalizálása DNS - DNS hibridizációs kísérletekkel.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. A dolgozatban szereplő genetikai markerek

1.1. Auxotrófia markerek

arg - arginin	phe - fenilalanin
cys - cisztein	pro - prolin
glt - glutaminsav	pur - purin
gly - glicin	pyr - pirimidin
his - hisztidin	trp - triptofán
leu - leucin	tyr - tirozin
met - metionin	

1.2. Antibiotikum rezisztencia markerek

Kromoszómális markerek :	Plazmid markerek :
nov - novobiocin	Ap - ampicillin
rif - rifampicin	Cb - karbenicillin
str - streptomycin	Gm - gentamicin
5FU - 5-fluoro-uracil	Km - kanamicin
	Sm - streptomycin
	Tc - tetraciklin

1.3. Egyéb markerek és rövidítések

att ₁₆₋₃	- a <i>R. meliloti</i> 41 16-3 fágjának kötődési helye
cma	- kromoszóma mobilizációs képesség
fix	- nitrogénkötésért felelős gének
nar	- a nitrát reduktáz enzim szintéziséért felelős gének
nif	- a nitrogenáz enzim szintéziséért felelős gének
nod	- gümőképzésért felelős gének

2. Baktérium törzsek és plazmidok

2.1. Baktérium törzsek

R. meliloti 41 törzsek

TÖRZS	JELLEMZÉS
AK352	<u>narB-15 pur-15 rif-8</u>
AK551	<u>his-210 leu-4 str-3</u>
AK631	<i>R. meliloti</i> 41 vad típus /kompakt telep morfológia/
AK627,AK635,AK641,AK642	AK631 hőkezeléséből származó Nod ⁻ mutánsok
AK682	AK684 <u>trp-20::Tn5</u>
AK684	AK631 Str ^R
AK704	AK631 Rif ^R
AK1282	AK631 <u>nifH::Tn5</u> /pPH1JI/
EV88	<u>gent-2 narB-15 trp-15</u>
EV112	<u>his-1 5FU-1</u> /R68.45/
EV119	<u>cys-46 rif-3</u>
EV171	<u>cys-46 phe-15 str-3</u>
EV180	<u>gly-1 pur-4 trp-15 str-3</u> /R68.45/
EV181	<u>gly-1 leu-4 str-3</u>
EV184	<u>gly-1 met-2 pur-4 str-3</u>
EV197	<u>leu-4 phe-15 rif-5 str-3</u>
GY561	AK631 "fagyasztás" után izolált Nod ⁻ mutánsa
GY832	AK684 NTG kezelés után izolált Nod ⁻ mutánsa
JA7	AK631 Tn5-mutagenézis után izolált Fix ⁻ / <u>fix-4</u> / mutánsa
TF178	AK684 <u>fix-2::Tn5</u>
ZB72,ZB73,ZB74,ZB75,ZB76 ZB79,ZB83,ZB84,ZB85	AK631::Tn5 /Tn5 beépülési helye ismeretlen/

ZB121	ZB78 hőkezeléséből származó Nod ⁻ , Km ^S mutáns
ZB125	ZB73 hőkezeléséből származó Nod ⁻ mutáns
ZB126	ZB75 hőkezeléséből származó Nod ⁻ mutáns
ZB135, ZB138	ZB78 hőkezeléséből származó Nod ⁻ , Km ^S mutánsok
ZB139	ZB78 hőkezeléséből származó Nod ⁻ mutáns
ZB147	ZB84 hőkezeléséből származó Nod ⁻ , Km ^S mutáns
ZB155	ZB139 <u>his-1</u> <u>5FU-1</u> /R68.45/
ZB156	ZB125 <u>his-1</u> <u>5FU-1</u> /R68.45/
ZB157, ZB158, ZB159	ZB72-85 törzseket tartalmazó populáció hőkezeléséből származó Nod ⁻ , Km ^S mutánsok
ZB273, ZB274, ZB276, ZB277, ZB278, ZB313, ZB314, ZB315, ZB316	AK631 Tn5-mutagenézis után izolált Fix ⁻ mutánsai
ZB306, ZB308, ZB310	AK631 Tn5-mutagenézis után izolált Nod ⁻ mutánsai

Az AK-val jelölt törzsek Kondorosi Ádám, az EV-vel Vincze Éva, a GY-nal Kiss György, a JA-val Jacek Plazinski, a TF-fel Forrai Tamás törzsgyűjteményéből származnak. A ZB-vel jelölt törzseket az V. fejezetben szereplő kísérletekkel izoláltam.

Egyéb Rhizobium törzsek:

TÖRZS	JELLEMZÉS	SZÁRMAZÁS
1A-113	<i>R. meliloti</i> 102F51 Nod ⁻ mutánsa	W. Leps
6015	<i>R. leguminosarum</i> <u>phe-1</u> <u>trp-12</u> <u>rif-392</u> <u>str-37</u> <u>nod-6007</u>	Johnston és mtsai., /1978/
AK1103	6015 /pJB5JI/	



E.coli törzsek:

TÖRZS	JELLEMZÉS
AK687	NF859 /pJB4JI/
GY611	HB101 Rif ^R /pGY1/
HB101	<u>hsdS hsdM pro leu thi gal lacY recA str</u>
NF859	<u>argA metB relX⁺ relA⁺</u>
ZB189	HB101 /pJB3JI/

2.2. Plazmidok

PLAZMID	JELLEMZÉS	SZÁRMAZÁS
R68.45	Cb ^R Km ^R Tc ^R Cma ⁺ Inc-P1	Haas és Holloway /1976/
pJB3JI	Cb ^R Km ^S Tc ^R Cma ⁺ Inc-P1	Brewin és mtsai., /1980/
pJB4JI	Gm ^R Sm ^R ::Mu::Tn5	Beringer és mtsai., /1978/
pJB5JI	a <i>R. leguminosarum</i> nod, <u>fix</u> géneket és Tn5 transzpozont hordozó pRL1-es plazmidja	Johnston és mtsai., /1978/
pBR322	Ap ^R Tc ^R	Bolivar és mtsai., /1972/
pHC79	Ap ^R Tc ^R	Hohn és Collins /1980/
pKJ243	a pHC79 <i>R. meliloti</i> 41 <u>nif</u> strukturgéneket hordozó származéka	Bánfalvi és mtsai., /1981/
pID1	a pBR322 <i>R. meliloti</i> 41 <u>nif</u> strukturgéneket hordozó származéka	Bánfalvi és mtsai., /1981/
pGY1	Az R68.45 <u>cys-24-att16-3</u> <i>R. meliloti</i> 41 kromoszómális régión hordozó származéka	Kiss és mtsai., /1980/
pHM5	pJC307::Tn5	Meade és mtsai., /1982/

3. Táptalajok és higitók

3.1. Táptalajok

Komplett tápfolyadékok és táptalajok :

YTB	a <i>R.meliloti</i> és <i>E.coli</i> törzsek növesztésére használt élesztőkivonatot és triptont tartalmazó tápfolyadék /Orosz és mtsai., 1973/
YTA	YTB + 2% Bacto Agar /Difco/
TY	a <i>R.leguminosarum</i> törzsek növesztésére használt élesztőkivonatot és triptont tartalmazó tápfolyadék, illetve táptalaj /Beringer, 1974/.

Minimál tápfolyadékok és táptalajok :

GTS /alap/	NH ₄ Cl-dal, glükózzal és Na-szukcináttal kiegészítve a <i>R.meliloti</i> és <i>E.coli</i> törzsek növesztésére használt minimál tápfolyadék, illetve 2% agarral kiegészítve táptalaj /Kiss és mtsai., 1979/.
FNO ₃	GTS + fumársav és NaNO ₃ ; a nitrátot, mint egyedüli nitrogén forrást nem hasznosító mutánsok tesztelésére használt táptalaj /Kiss és mtsai., 1979/.
NFDM	nitrogén mentes tápfolyadék /Cannon és mtsai., 1974/

A táptalajok kiegészítése :

A minimál táptalajokat a törzsek auxotróf mutációinak megfelelően 50 µg/ml aminosavval, illetve 25 µg/ml purin vagy pirimidin bázissal egészítettem ki.

A *R.meliloti* törzsek esetén használt antibiotikum koncentrációk :

kanamicin	- 200 µg/ml
streptomycin	- 250 µg/ml
tetraciklin	- 15 µg/ml
5-fluoro-uracil	- 5 µg/ml

Az *E.coli* törzsek esetén használt antibiotikum koncentrációk :

kanamicin	- 30 µg/ml
tetraciklin	- 15 µg/ml

Növényi táptalaj :

Gibson - ásványi sókat és nyomelemeket tartalmazó
nitrogén mentes táptalaj, 1,2% agarral
/Gibson és Nutman, 1960/.

3.2. A baktériumok higitására használt folyadék

Fiziológiás sóoldat /0,9% NaCl/

4. A baktériumok szaporítása és eltartása

A *R.meliloti* törzseket levegőztetéssel, 34°C-on, a *R.leguminosarum* törzseket 30°C-on, az *E.coli*-t 37°C-on növesztettem.

A törzseket 20 : 80 arányu glicerinnel : komplett tápfolyadék elegyben -20°C-on tartottam fenn.

5. A mutánsok előállítása

5.1. Hőkezelés

A hőkezelést Zurkowski és Lorkiewicz /1978/ által leírt módszer módosításával végeztem.

A hőkezeléshez a *R. meliloti* 41 törzseket 5×10^7 - 1×10^8 sejt/ml-ig komplett tápfolyadékban /YTB/ levegőztetéssel növesztettem, majd 10-14 napig $39,5 - 40^\circ\text{C}$ -on tartottam, a levegőztetést /rázatást/ $2 \times 5'$ -re csökkentettem.

5.2. Transzpozíciós mutagenézis

A transzpozíciós mutagenézishez a pJB4JI plazmidot /Beringer és mtsai., 1978/ használtam.

A *R. meliloti* 41 Tn5 transzpozont hordozó származékait az AK687 x *R. meliloti* 41 keresztezés / 30°C -on/ elvégzése után a Tn5 *R. meliloti*-ban megnyilvánuló Km és Sm rezisztenciájára /Nagy Anikó, 1981/ szelektálva GTSKmSm lemezen izoláltam. A "testvér"-telepek megjelenésének elkerülésére rövid ideig tartó keresztezést /6, illetve 12 h/ használtam.

A szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálásához a prototróf $\text{Km}^R \text{Sm}^R$ baktérium telepeket kétszer komplett /YTA/, majd szelektív lemezen /GTSKmSm/ 1 telepre tisztítottam. Mindegyik teleppel külön-külön 1-1 két lucerna növényt tartalmazó csövet fertőztem. Az első növényi teszt elvégzése után kapott Nod^- és Fix^- mutánsokat egy második 5 párhuzamosban végzett növényi teszttel

ellenőriztem.

6. Konjugáció, genetikai térképezés

6.1. Konjugáció

A keresztezéseket a donor és recipiens 5×10^8 -
- 1×10^9 sejt/ml folyadék tenyészetének 1 : 1 arányu ke-
verékével szilárd komplett táptalajon /YTB/ 34°C -on éj-
szakán át végeztem /kivéve a *R. leguminosarum* és *R. meli-*
loti 41 közti keresztezést, ahol TY táptalajt és 30°C
hőmérsékletet használtam/.

A keresztezés után a baktériumot fiziológiás sóoldat-
ban felfuszpendáltam és a megfelelő higitásban szelek-
tiv lemezekre szélesztettem /Kondorosi és mtsai., 1977/.

6.2. A Nod⁻ mutációk gyorstérképezése

Donor törzs előállítása:

A Nod⁻ mutánsokba az R68.45 plazmidot az EV112 /his-1,
5FU-1, R68.45/ törzsből az 5FU^R átvitelére szelektálva
vittem be. Mivel az 5FU-1 és a his-1 markerek 50%-os
kapcsoltságot mutatnak, az 5FU^R rekombinánsok GTS és
GTS_{his} lemezre történő csikozása után olyan új donor tör-
zseket is izolálhattam, amelyek az 5FU^R-án kívül a his-1
mutációt is hordozták. Ez az auxotrófia mutáció a további
keresztezésekben a donor elleni szelekciót biztosította.
Mivel az R68.45 aránylag nagy gyakorisággal spontán el-
veszti Cma⁺ tulajdonságát /Kondorosi és mtsai., 1977/,
az új donor törzsek Cma képességét is ellenőrizni kellett.



Ehhez öt 1 telepre tisztított donor törzs és az EV119 /cys-46/ között keresztezéseket végeztem /"csöpp-teszt"/ cys⁺ rekombinánsokra szelektáltam. A rekombinánsok megjelenési gyakorisága alapján általában 1-2 megfelelő Cma képességgel rendelkező donor törzset találtam.

Térképezés:

A Nod⁻ donor törzset kereszteztem a megfelelő többszörösen auxotróf recipiensekkel. Prototróf rekombinánsokra szelektáltam. A donor elleni szelekciót a his-1 /nem revertáló/ mutáció biztosította, a phe-15 - leu-4 régió kivételével, ahol ellenszelekcióként rifampicint használtam.

A trp-15 - narB-15 és narB-15 - pur-15 régió vizsgálatkor trp⁺, illetve ade⁺ rekombinánsokra szelektáltam, majd a rekombinánsok utólagos vizsgálatával nitrát reduktáz teszt alapján trp⁺ narB⁺, illetve ade⁺ narB⁺ fenotípusu telepeket kerestem.

Nitrát reduktáz teszt: a nitrát reduktáz működését a $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ átalakítás alapján Griess-Ilosvay reagenssel /1% szulfanilsav 30%-os ecetsavban és 0,3% 1-naftilamin 30%-os ecetsavban oldva, 1 : 1 arányu elegye/, színreakcióval mutattam ki. A vizsgálandó baktériumot YTA lemezre csikozva felnövesztettem, 10 mM NaNO_3 -tal nedvesített szűrőpapírral légmentesen lefedve 15'-ig szobahőmérsékleten tartottam, majd 1 ml Griess-Ilosvay reagenst öntöttem rá. A színreakció alapján felismerhetővé váltak az aktiv nitrát reduktázzal rendelkező baktérium telepek /Kiss és mtsai., 1979/.

A keresztezésekből származó prototróf rekombinánsokat kétszer komplett, majd minimál táptalajon tisztítottam, és egyenként növényi tesztben vizsgáltam meg gümőkötő képesség szempontjából.

7. Növényi teszt

A *Rhizobium* törzsek effektivitásának vizsgálatához lucernát (*Medicago sativa* L.) használtam.

Magsterilizálás :

96% etanol 15'; 0,2% HgCl₂ 3'; 3 x mosás steril desztillált vízben; 30' rázatás steril desztillált vízben; 3 x mosás steril desztillált vízben; 12,5% hipo 3'; 5 x mosás steril desztillált vízben.

Magok csiráztatása :

1%-os desztillált vizes agaron Petri csészében szobahőmérsékleten, sötétben, 1 napig.

Növények fertőzése *Rhizobiummal* :

A csiranövényeket vattával lezárt 12 ml ferdén merevített Gibson tápagart tartalmazó steril kémcsövekbe helyeztem. A baktériumokat szilárd táptalajon növesztettem, 1 ml NFDM folyadékban felszuszpendáltam, és 0,1 ml/cső / ~ 10⁸ sejt/cső / baktériummal fertőztem. Általában egy baktérium törzssel 3-5 növényt fertőztem.

Növények nevelése :

20-25°C-os üvegházban, 16 h napi megvilágítással.

Növényi teszt kiértékelése :

Az első gümők 10-14 nap után jelentek meg, a növényi teszteket 4 hét után értékeltem. Megszámoltam a gümők

számát és vizsgáltam a törzsek effektivitását. Az effektivitást két módon határoztam meg :

1. a növény szárazsúlyának mérése alapján;
2. a nitrogenáz enzim által katalizált acetilén redukció alapján /Dilworth, 1966/, Perkin-Elmer 3920B gázkromatográfon Poropak R oszloppal.

8. Agaróz gélelektroforézis

A különböző DNS-ek elektroforéziséhez Helling és munkatársai /1974/ módszere alapján függőleges /17 cm x 14 cm x 0,3 cm/ 0,7-1% agaróz /Sigma Type V/ géleket készítettem.

Tisztított DNS-ek elektroforéziséhez használt puffer: 50 mM Tris; 20 mM NaCl; 2 mM EDTA; 20 mM Na-acetát; pH 8,05.

Futtatás: 20 mA éjszakán át vagy 40 mA 8 h.

Elektroforézis után a gélt 1 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó pufferben tartottam 20'-ig, majd UV fényben fényképeztem.

9. DNS-ek kimutatása és izolálása

9.1. Plazmidkimutatás

A különböző méretű plazmidok kimutatására az Eckhardt /1978/ által leírt módszert használtam.

A baktériumokat korai log. fázisig YTA lemezen 12 órán keresztül növesztettem. Kis mennyiséget /~ 10⁷ sejt/

Eppendorf csőben felszuszpendáltam 100 µl lizozim tartalmu oldatban, majd ebből azonnal 40 µl-t felvittem az agaróz géltre /10 mm x 8 mm x 3 mm-es lyukakba/. 10' lizis idő után 40 µl, majd 120 µl SDS tartalmu oldatokat rétegeztem rá, és lefedtem agarózzal. A futtatást 1 órán keresztül 8 mA-en, majd 3 órán keresztül 40 mA-en végeztem.

9.2. Össz-DNS-ek izolálása

Az össz-DNS-eket Dhaese és munkatársai /1979/ által leírtak szerint izoláltam.

9.3. Plazmid DNS-ek izolálása

A pRme41a és pKJ243 plazmid DNS-eket Hirsch és munkatársai /1980/ módszere szerint izoláltam.

A pHM5 plazmid DNS izolálására Birnboim és Doly /1979/ módszerét alkalmaztam, de nagyobb térfogatu /1 liter/ baktérium stac. fázisu kulturájából kiindulva. A preparálás elvégzése után a CCC plazmid DNS-t CsCl-etidium-bromid egyensulyi grádiens ultracentrifugálással /Clewell és Helinski, 1970/ választottam el a lineáris kromoszóma, illetve plazmid töredékektől.

9.4. DNS fragmentek izolálása

A restrikciós enzimmel emésztett tisztított DNS-t 0,6%-os agaróz /Sigma Type VII/ gélből izoláltam. A megfelelő DNS-csik kivágása után a gélt 65°C-on felolvasztottam és 3 ml térfogatra feltöltöttem TE /10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 7,4/ pufferrel. Az agarózt fenolos és klo-

roformos kirázással eltávolítottam. A DNS-t alkoholos kicsapás után TE pufferben feloldottam.

10. DNS-ek emésztése restrikciós enzimekkel

Restrikciós enzimek : HindIII /Dusha Ilona által
készített preparátum/

PstI /Boehringer, Mannheim/

Az emésztést a Boehringer Mannheim /1981/ enzim katalógusban található előírások alapján végeztem.

11. DNS - DNS hibridizáció

11.1. Hibridizációs próba készítése

A tisztított DNS-eket α -³²P-ATP felhasználásával nick-transzlációval /Righby és mtsai., 1977/ jelöltem.

11.2. Southern hibridizáció

Az agaróz gélben megfuttatott DNS-eket nitrocellulóz /Millipore, HAWP/ filterre vittem át /Southern, 1975/. Az Eckhardt gélben megfuttatott nagy molekulásulyu plazmidok filterhez kötődését a DNS molekulák UV fényel történő törésével /Desaga MinUVS lámpa, 10', 10 cm-es besugárzási távolság/ és 0,25 N HCl /15'/ kezeléssel segitettem elő.

A hibridizáció előtt a filtereket 5-6 órán át 37°C-on 5 x SSC-t, 50% formamidot és 0,02% bovin serum albumint, polivinilpirrolidint és ficollt tartalmazó oldatban áz-

tattam.

A hibridizálást 24 órán keresztül 37°C -on végeztem. A hibridizációs próba $1-5 \times 10^5$ cpm/ml jelölt DNS-t tartalmazott, összetétele megegyezett a hibridizáció előtt használt oldat összetételével.

Hibridizáció után a filtereket $2 \times \text{SSC}$ -vel mostam 37°C -on, majd szárítottam. Az expozícióhoz Kodak X-omat röntgen filmet és Ilford Tungstate "screen"-t használtam. Az expozíciós idő a kísérletektől függően 2-15 nap volt.

11.3. Hibridizáció gélbe szárított DNS-hez

A gélbe szárított DNS-sel végzett hibridizációhoz Shinnick és munkatársai /1975/ és Tsao és munkatársai /közlés alatt/ által módosított módszerét használtam.

Az agaróz gélben megfuttatott DNS denaturálása és neutralizációja után a gélt 1 liter desztillált vízben mostam /1-2'/ és üveglapra helyezve megnedvesített celofánnal lefedve infra-lámpa alatt ventilátorral hűtve 2-3 óráig szárítottam.

A hibridizáció előtti kezelés és a próba összetétele megegyezett a Shouthern hibridizációnál használttal. A DNS-eket 42°C -on $0,5 \text{ ml/cm}^2$ mennyiségű próbával 24 órán át hibridizáltattam.

A gélt mosás / 65°C , 1 liter $2 \times \text{SSC} + 0,5\%$ SDS; 4 x 1 liter $2 \times \text{SSC}$; 1 liter $1,5 \times \text{SSC}$, 1 liter $1 \times \text{SSC}$ / után megszáritottam. A röntgen film expozíciós ideje 2-3 nap volt. A gélbe szárított DNS-hez való hibridizáció nagy molekulásulyu plazmidok esetében a Shouthern hibridizációnál hatásosabbnak bizonyult.

V. EREDMÉNYEK

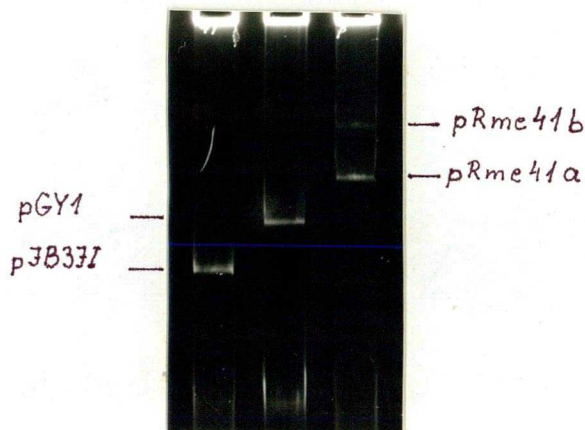
1. Két nagy molekulásulyu plazmid kimutatása a *Rhizobium meliloti* 41-ben

A Currier és Nester /1976/, Casse és munkatársai /1979/, Hirsch és munkatársai /1980/ által leírt módszerekkel a *R. meliloti* 41-ből csak egy 140 Md-os plazmid izolálható. Ezzel szemben egy olyan plazmid kimutatási módszerrel /Eckhardt, 1978/, amellyel a cirkuláris DNS-ek mechanikai törése szinte teljesen elkerülhető, két nagy molekulásulyu plazmidot tudtam kimutatni a *R. meliloti* 41-ben /4. ábra/.

Összehasonlítva elektroforetikus mobilitásukat ismert molekulásulyu plazmidokkal megállapítottam, hogy az alsó csík megfelel a 140 Md-os plazmidnak, míg a felső egy eddig ismeretlen, nagyobb, mint 300 Md-os plazmid jelenlétére utal.

A *Rhizobium* plazmidokra javasolt elnevezés szerint /Casse és mtsai., 1979/ a 140 Md-os plazmidot pRme41a-nak, míg a nagyobbat pRme41b-nek jelöltem.

4. ábra Plazmidkimutatás Eckhardt /1978/ szerint



1. ZB189 /pJB3JI, 36,8 Md/
2. GY611 /pGY1, 54,4 Md/
3. AK631 /pRme41a, 140 Md; pRme41b, >300 Md/



2. Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás *R. meliloti* 41 mutánsok izolálása

2.1. Transzpozíciós mutagenézis

A *R. meliloti* 41 szimbiotikus nitrogénkötésért felelős génjeinek lokalizálásához célunk volt először a génnek hagyományos mikrobiológiai technikákkal közvetlenül szelektálható fenotípusu, és fizikai módszerekkel /pl.: DNS-DNS hibridizációval/ is felismerhető markerrel, transzpozonnal, törtéző jelölése.

Ezt a transzpozíciós mutagenézist a pJB4JI plazmiddal /lásd: II. fejezet 1.1.2. pontja/ végeztem. A Tn5 antibiotikum rezisztenciájára /Km^R Sm^R/ szelektálva transzpozíciós származékokat 10⁻⁷ gyakorisággal kaptam.

A mutagenézis hatásosságának ellenőrzésére megvizsgáltam az auxotróf és a nitrátot, mint egyedüli szénforrást nem hasznosító mutánsok megjelenési gyakoriságát /2. táblázat/. Ez a várt értékkel /Beringer és mtsai., 1978/ azonos, illetve az auxotrófok esetében még jóval magasabb is volt.

A szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálására, 11 független keresztezésből származó 3 400 baktérium telepet vizsgáltam meg növényi tesztben. Összesen 12 Fix⁻ és 3 Nod⁻ mutánst kaptam.

2. táblázat A transzpozíciós mutagenézis hatásossága

Mutagenizált törzs	Mutáns fenotipusa	Mutáns fenotípus megjelenési gyakoriság %
AK704	auxotróf	10
AK631	No ₃ ⁻ -t nem hasznosító	0,2
	Fix ⁻	0,4
	Nod ⁻	0,1

2.2. Hőkezelés

A szimbiotikus gének lokalizálására a másik kiindulási lehetőség szimbiotikus mutánsok hőkezeléssel történő előállítására volt.

A hőkezelés R faktor törlő hatása ismert volt a *R.meliloti* 41-ben /lásd: II. fejezet 1.1.3. pontja/. Felteteleztük, hogy a módszer alkalmas lesz a törzs endogén plazmidjainak kurálására is.

Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálására a genom ismeretlen helyein Tn5 transzpozont hordozó mutánsokból indultam ki. A hőkezelés elvégzése után összefüggést kerestem a Tn5 által hordozott Km^R elvesztése és a Nod⁻, vagy Fix⁻ fenotípus megjelenése között. Így olyan származékokat is izolálhattam, amelyekben a Tn5 a szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó géneket hordozó plazmidon található.

A hőkezelést Zurkowski és Lorkiewicz /1978/ a *R. trifolii*ra leírt módszerének módosításával végeztem. Megemeltem a hőmérsékletet a *R. meliloti* számára szubletális 39,5 - 40°C-ra és meghosszabbítottam a kurálási időt, amit a *R. meliloti* jobb hőtürése indokolt.

Tíz napos hőkezelés után a véletlenszerűen kiválasztott 13 prototróf, Tn5 transzpozont hordozó baktériumból származó populációkból mintát vettem. Komplet táptalajon felnövesztett 100 - 1 000 közti baktérium telepet replikációs technikával vizsgálva megállapítottam a Km^R elvesztési gyakoriságát. Nagy gyakoriságot /50 - 100%/ három törzs esetében kaptam. Ezek közül kettőben deléciós pJB4JI származékot tudtam kimutatni Eckhardt gélen, valószínűleg a Tn5 is ezen a plazmidon található. A harmadik törzsben /ZB78/ pJB4JI származék nem volt.

Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálására a különböző hőkezelt populációkból 10-10 baktérium telepet vizsgáltam meg növényi tesztben. Mutánsokat változó számban, de szinte mindegyik kurált törzsből kaptam. Összesen 32 Nod⁻ és 8 Fix⁻ mutánst izoláltam.

Feltűnően magas gyakorisággal egy törzsből, a ZB78-ből jelentek meg Nod⁻ mutánsok /3. táblázat/. A Tn5 elvesztése mindig Nod⁻ fenotípust eredményezett. Ennek alapján feltételezhető volt, hogy a Tn5 beépülési helye szerepet játszhat a Nod⁻ mutánsok megjelenésében.

3. táblázat A hőkezelés hatása a különböző *Rhizobium meliloti* 41 törzsekre

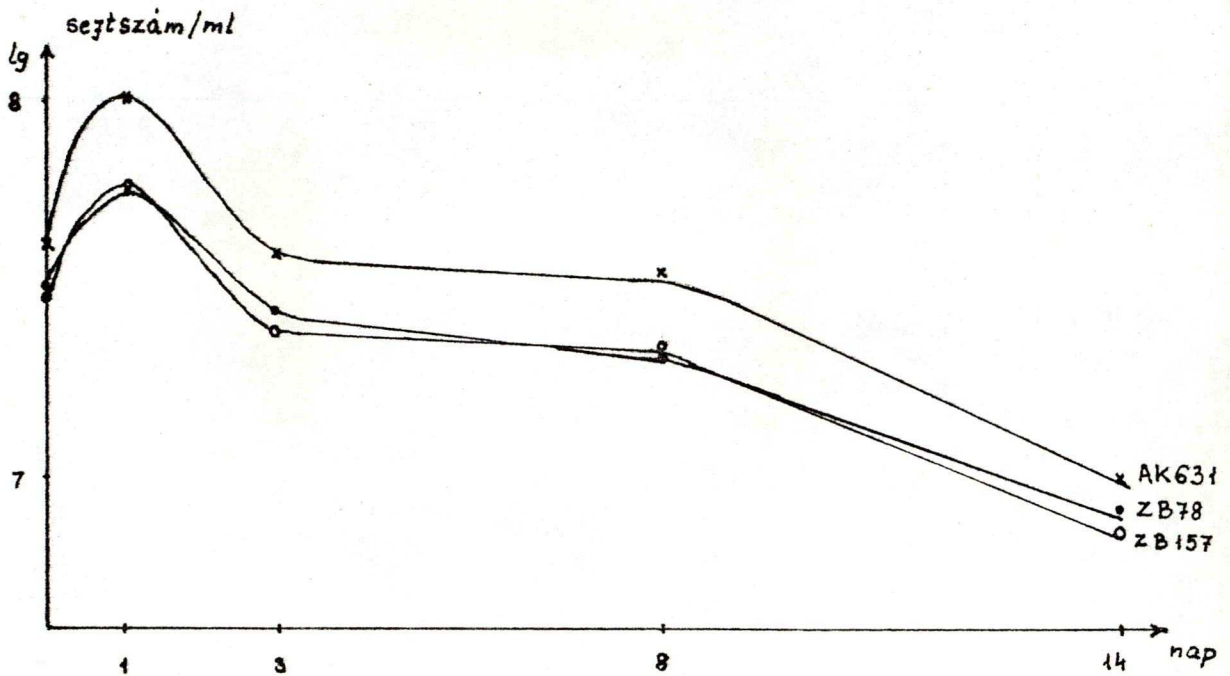
TÖRZS	Tn5 jelenléte	Megvizsgált telepszám	F e n o t i p u s		
			Km rezisztencia	Nod ⁻	Fix ⁻
ZB78	+	47	Km ^R 23	12	0
			Km ^S 24	24	0
AK682	+	48	Km ^R 38	3	9
			Km ^S 10	0	4
TF178	+	49	Km ^R 49	1	
			Km ^S 0		
JA7	+	49	Km ^R 49	0	
			Km ^S 0		
AK631	-	49		0	5

3. A hőkezelésből származó Nod⁻ mutánsok genetikai analízise

3.1. A Nod⁻ mutánsok szaporodása magas hőmérsékleten

Annak eldöntésére, hogy volt-e a Nod⁻ mutánsoknak szelektív előnyük a kiindulási törzssel szemben a hőkezelés folyamán, összehasonlítottam a vad típusu *R. meliloti* 41, egy Tn5-ös származéka és Nod⁻ mutánsának szaporodási görbéit /5. ábra/.

5. ábra A *R. meliloti* 41 és származékainak szaporodása magas hőmérsékleten



Mivel a szaporodási görbék lefutása mindhárom esetben hasonló volt, megállapítottam, hogy a Nod^- mutánsoknak nem volt szaporodási előnyük a magas hőmérsékleten. Ebből következik, hogy nem előzetesen meglévő spontán Nod^- mutációval rendelkező egyedek dusultak fel a baktérium populációban, hanem a hőkezelés alatt, a hő hatására jöttek létre a Nod^- törzsek.

3.2. Reverziós analízis

A hőkezelésből származó Nod^- mutánsokból Nod^+ reverzánst nem kaptam. A ZB157-es törzsszel 10^{10} sejt/cső mennyiséggel fertőztem 10 két-két lucerna növényt tartalmazó csövet, de gümők egyik növényen sem jelentek meg.

3.3. A Nod⁻ mutációk genetikai térképezése

Két Nod⁻ mutáns, ZB125, ZB139 térképezésére a munkacsoportunk által kidolgozott gyors térképezési módszert használtam /II. fejezet, 1.2.3. pont/.

A ZB125 és ZB139 törzsekből az R68.45 plazmid bevitelével donor törzseket /ZB156, ZB155/ állítottam elő és kereszteztem a megfelelő recipiensekkel /a kísérlet részletes leírása a IV. fejezet 6.2. pontjában/. Az így kapott rekombinánsokat növényi tesztben vizsgáltam meg gümőképzés szempontjából. Ennek eredményét a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat Nod⁻ mutánsok genetikai térképezése

RECIPIENS	VIZSGÁLT RÉGIÓ	Nod ⁻ rekomb. szám	
		vizsgált rekomb. szám	
		Donor: ZB156	Donor ZB155
EV119	rif-1 - cys-46	0/5	0/2
EV171	cys-46 - phe-15	0/5	0/4
EV197	phe-15 - leu-4	0/5	0/5
EV181	leu-4 - gly-1	0/5	
AK551	leu-4 - his-210		0/5
EV184	met-2 - ade-4		0/3
	ade-4 - gly-1		0/5
EV180	gly-1 - trp-15	0/5	0/3
EV 88	trp-15 - narB-15	0/1	0/2
AK352	narB-15- rif-1	0/5	0/5

Mindkét donor Nod⁻, minden recipiens Nod⁺ fenotípusu volt. Minden rekombináns három, 2-2 lucerna növényt tartalmazó csőben vizsgáltam.

A gyorstérképezési rendszer alapján egy vizsgált mutáció arra a régióra lokalizálható, amelyik rekombináns kategóriában a mutáns fenotípusa kimutatható. A Nod^- mutánsok /ZB125, ZB139/ térképezésénél Nod^- fenotípusu rekombináns kategóriát nem találtam. Ebből arra következtettem, hogy a Nod^- tulajdonság extrakromoszómális mutáció eredménye.

3.4. A Nod^- mutánsok csoportosítása komplementációs analízissel

A komplementációs analízishez egy másik *Rhizobium* faj, a *R. leguminosarum* nodulációs génjeit használtam. Bár a *R. meliloti* és *R. leguminosarum* gazdanövénye eltérő, de a gümőképzés lépéseinek, folyamatának hasonlósága alapján feltételezhető volt, hogy számos nodulációban szerepet játszó gén, a gazdaspecifitást meghatározó gének kivételével, közös vagy igen hasonló lehet. Ezért várható volt az is, hogy a *R. leguminosarum* nod génjeinek a *R. meliloti* Nod^- mutánsaiba történő bevitele bizonyos mutánstípusokban a gümőképzés helyreállítását fogja eredményezni.

A *R. leguminosarum* 248 nod génjeit számos fix génnel együtt egyik transzferábilis endogén plazmidja a pRL1JI hordozza /II. fejezet 3.5. pontja/. A pRL1JI Tn5-tel jelölt származéka a pJB5JI. Ezt a plazmidot vittem át konjugációval a *R. leguminosarum*ból a *R. meliloti* Nod^- pontmutánsaiba és hőkezelésből származó Nod^- törzseibe. /A plazmid-transzfer gyakorisága az 1A-113

törzsnél 10^{-5} , a *R. meliloti* 41 származékknál 10^{-7} nagyságrendű volt./ A transzkonjugánsokat lucerna gazdanövényen vizsgáltam gümőképzés és effektivitás szempontjából, úgy, hogy a szelektív táptalajon kapott összes teleppel egy populációként fertőztem 3 csövet, illetve 2-2 különálló telepet előzőleg egy telepre tisztítottam komplett /TY/ táptalajon, majd szelektív körülmények között, és ezzel fertőztem 3-3 csövet. A populációval és a tisztított telepekkel végzett kísérletek eredményei minden esetben megegyeztek, ami arra utalt, hogy a pJB5JI stabilan fennmarad a *R. meliloti*-ban /5. táblázat/.

5. táblázat A pJB5JI plazmid bevitele a *R. meliloti* különböző Nod⁻ mutánsaiba

R E C I P I E N S	TRANSZKONJUGÁNSOK FENOTIPUSA	
	Nod	Fix
1A - 113	+	+
GY832	+	+
ZB157	+	-
GY561, AK627, AK635 AK641, AK642, ZB121 ZB135, ZB138, ZB147 ZB158, ZB159	-	-

Mint az 5. táblázat eredményei mutatják, a *R. leguminosarum* eredetű pJB5JI plazmid helyreállította a gümőképzést lucerna gazdanövényen három *R. meliloti* Nod⁻ mutánsban. A *R. meliloti* 102F51 törzsében 1A-113 jelű Nod⁻ pont-

mutánsában és a *R. meliloti* 41 1823-as NTG-kezelésből származó mutánsában a gümőképzés helyreállása együttjárt az effektivitás helyreállításával. A hőkezelésből származó mutánsok közül csak a ZB157 volt komplementálható, de az itt megjelenő gümők ineffektívek voltak. Ebből arra következtettem, hogy a ZB157 törzsből a hőkezelés hatására nemcsak nod gének, hanem valószínűleg fix gének is elvesztek. A többi 11 Nod⁻ mutánsban a pJB5JI nem állította helyre a gümőképzést. Ezekről feltételezhettem, hogy a mutáció gazdaspecifitást meghatározó géneket is érint, vagy a *R. meliloti* nodulációs génjeinek egy része nincs jelen a pJB4JI plazmidon, illetve nem homológ a *R. leguminosarum* nodulációs génekkel.

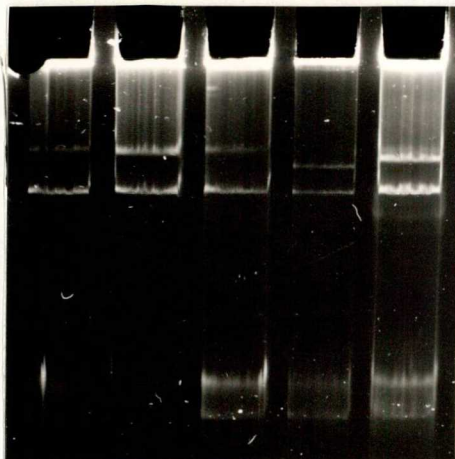
4. Nod, nif gének lokalizálása a pRme41b plazmidra

4.1. Deléció kimutatása néhány Nod⁻ törzs pRme41b plazmidján

A hőkezelést, amellyel Nod⁻ mutánsainkat izoláltuk, plazmid elimináló hatásúnak tartottuk. A plazmid elvesztést Eckhardt-féle gélelektroforézissel próbáltam meg kimutatni.

11 Nod⁻ mutánst vizsgáltam meg. Mindegyikben mindkét *R. meliloti* 41 endogén plazmid jelen volt, de 4 mutánsban a pRme41b megnövekedett elektroforetikus mobilitást mutatott /6. ábra/, jelezve, hogy nagy méretű deléció keletkezett rajta.

6. ábra Deléció kimutatása a Nod^- törzsekben
/Plazmidkimutatás Eckhardt-módszerrel/



1. ZB157; 2. ZB147; 3. AK631; 4. ZB126; 5. ZB121

Azokban a mutánsokban, ahol a pRme41b mérete a deléció következtében kisebb lett, időnként egy harmadik vékony csíkot is megfigyeltem az eredeti pRme41b-nek megfelelő mobilitással. Így nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a *R. meliloti* 41 esetleg egy harmadik plazmidot is hordoz és ennek jelenléte miatt nem találhatók meg azok a mutánsok, amelyekben a pRme41b tökéletesen eliminálódott.

A kísérletből levonható legfontosabb következtetés azonban az, hogy a pRme41b plazmidon valószínűleg nod gének találhatók, amelyek a hőkezelés hatására létrejött deléciók következtében elvesztek.

4.2. Nif gének lokalizálása a pRme41b plazmidra

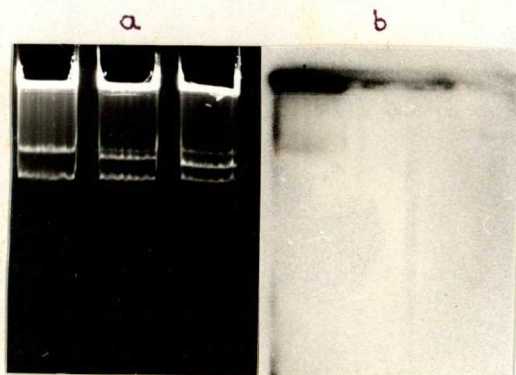
Korábbi kísérleteinkben Fix⁻ mutánsok genetikai térképezésével közvetett bizonyítékot szereztünk arra, hogy nemcsak a nod gének, de a fix gének egy része, köztük talán a nif gének is extrakromoszómális elhelyezkedésűek a *R.meliloti* 41-ben /II. fejezet 1.2.3. pontja/.

Ennek alátámasztására a *R.meliloti* 41 klónozott nif génjeinek, a pID1-es plazmidnak /II. fejezet 2.3. pont/ felhasználásával DNS - DNS hibridizációs kísérletet végeztem.

A *R.meliloti* 41 vad típusu törzsének plazmid DNS-eit Eckhardt-gélen szétválasztva /7. ábra; a/1/ megfelelő kezelés után nitrocellulóz filterre vittem. A pID1-ből izolált 4,8 kb-os nif fragmentumot nick-transzlációval ³²P-izotóppal jelöltem és hibridizáltam a filterhez kötött DNS-ekhez. A hibridizációs kép a 7. ábra b. oldalán látható.

A nif fragmentum csak a pRme41b plazmiddal hibridizált, tehát a *R.meliloti* 41-ben a nif gének, legalábbis a nitrogenáz enzim strukturgénjei, a pRme41b plazmidon található. /A gél tetejénél erős hibridizáció látható, mivel a plazmid DNS nagy része nem tud belépni a gélbe./

7. ábra Nif fragmentum hibridizációja a *R. meliloti* 41 vad típusu törzséhez és két deléciós Nod^- származékához



a/ Eckhardt gél;

b/ hibridizációs kép

1. AK631; 2. ZB121; 3. ZB138;

A hibridizációs próba aktivitása $1,8 \times 10^6$ cpm volt, a röntgen kép 14 napos expozícióval készült.

4.3. Nif gének elvesztésének kimutatása Nod^- mutánsokban

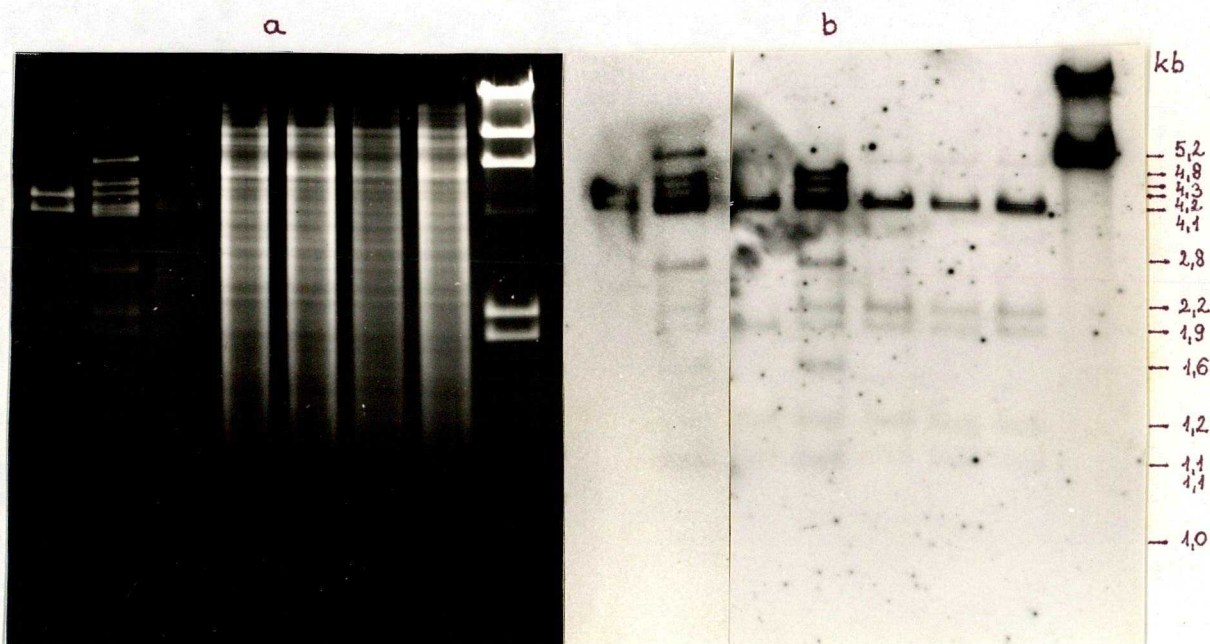
Az előző kísérletek eredményei /V.4.1.; V.4.2. fejezetek/ arra utaltak, hogy a pRme41b plazmidon nodulációs gének találhatóak, a hőkezelés hatására ebből a DNS régióból kisebb nagyobb szakaszok elvesztek, a Nod^- törzsekben deléciók keletkeztek. Hibridizációs kísérlettel azt is kimutattuk, hogy ugyanez a plazmid hordozza a nif strukturgéneket is. Így tehát feltételezhetjük, hogy a Nod^- mutánsokban a deléció a nif génekre is kiterjedhet.

A 7. ábrán látható, hogy valóban találtam olyan Nod^- mutánsokat, amelyekben a 4,8 kb-os nif fragmentum nem hibridizált a pRme41b plazmiddal, jelezve, hogy ezekben a törzsekben a nod génekkel együtt nif gének is elvesztek.

A Nod⁻ mutánsokban létrejött deléciók kiterjedésének vizsgálatára felhasználhattuk a pKJ243-as cosmid klónunkat is /II. fejezet 2.3. pontja/, amely a 4,8 kb-os nif fragmentumon kívül még aránylag nagy, 35,5 kb-nyi *R. meliloti* 41 extrakromoszómális DNS-t hordozott. Ezt a DNS-t, mint hibridizációs próbát használva, először a munkacsoportunkban dolgozó Vehary Sakanyan mutatott ki deléciót a hőkezelésből származó Nod⁻ mutánsok HindIII enzimmel emésztett össz-DNS-eiben. Az ő eredményeit felhasználva, a deléciók kiterjedésének pontosabb megállapítására a következő kísérletet végeztem el : a *R. meliloti* 41 vad típusu törzsének és néhány Nod⁻ származékának össz-DNS-ét PstI enzimmel emésztettem, a fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elválasztottam egymástól. A gélből a DNS-t nitrocellulóz filterre vittem és hibridizáltattam a ³²P-izotóppal jelölt pKJ243-as DNS-sel /8. ábra/.

Mivel az agaróz gélben megfuttatott DNS-ek, akár csak a pKJ243-ba épített extrakromoszómális DNS PstI fragmentumokat tartalmazott, ezért a 8. ábrán bemutatott kísérlet alapján megállapítható volt, hogy mely PstI fragmentumok azok, amelyek a Nod⁻ mutánsokból hiányzanak.

8. ábra A *R. meliloti* 41 és Nod⁻ származékainak hibridizációja a pKJ243-as próbával



a/ A különböző DNS-ek PstI emésztéséből származó fragmentumok 1%-os Tris-acetátos pufferrel készült agaróz gélben 20 mA 16 órás gélelektroforézis után;

b/ Hibridizáció a pKJ243-as próbával;

1. pID1; 2. pKJ243; 3. pRme41a; 4. AK631; 5. ZB126;
6. ZB138; 7. ZB147; 8. λ /HindIII/

A próba aktivitása $2,1 \times 10^7$ cpm volt, a röntgen kép 1.-2. oszlopa 10h, 3.-8. oszlopai pedig 2 napos expozícióval készültek. /A 1 kb-os fragmentumok a képen nem láthatók./

A 8. ábráról leolvasható :

1. A pKJ243 13 PstI fragmentumot tartalmaz /5,2; 4,8; 4,3; 4,2; 4,1; 2,8; 2,2; 1,9; 1,6; 1,2; 1,1; 1,1; 1,0 kb/. Ezek közül a pRme41a plazmidról származik a 4,1; 1,9; 1,2; az egyik 1,1 és az 1,0 kb-os fragmentum, amelyek minden Nod⁻ mutánsban jelen vannak.

2. Az Eckhardt gélen különböző méretű deléciókat mutató Nod⁻ mutánsokból /6. ábra/ a 4,8 kb-os nif fragmentum egyformán hiányzik.

3. Mindegyik Nod⁻ mutánsban jelen van egy nem pRme4la eredetű 2,2 kb-os fragmentum. Ennek két magyarázata lehetséges :

- A hiányzó fragmentumokkal nem folytonos a 2,2 kb-os DNS szakasz;
- a Nod⁻ mutánsokban a deléció egy meghatározott pontból indul, és ez rajta van a pKJ243 DNS-en.

A két feltételezés közül az elsőt tartom valószínűnek, de bizonyítására további kísérletek szükségesek.

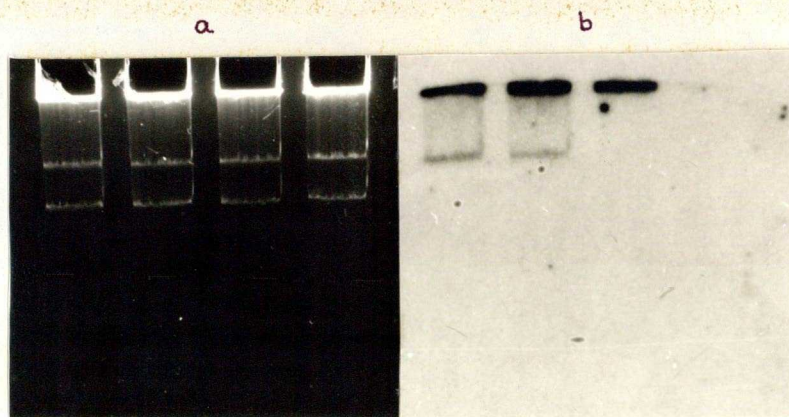
5. A Tn5 inszerció helyének lokalizálása a transzpozíciós mutagenézisből származó szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokban

A szimbiotikus nitrogénkötésben szerepet játszó gének lokalizálásának másik útja a transzpozíciós mutagenézissel előállított mutánsok vizsgálata volt. Az így izolált mutánsokban a Tn5 inszerció helyének megállapítására genetikai és hibridizációs módszereket egyaránt alkalmaztunk. /A genetikai vizsgálatokat a munkacsoportunkban dolgozó Gursharan Randhawa végezte, ennek eredményét a VI. fejezet 6. pontjában foglaltam össze./

A Tn5 mutagenézisből származó szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokban a Tn5 inszerció helyének megállapítása DNS - DNS hibridizációval :

A szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokat Eckhardt géltre vittem, a gélt beszárítottam és hibridizáltam a ^{32}P -izotóppal jelölt pHM5 [=pJC307::Tn5/ plazmid DNS-sel /9. ábra/.

9. ábra A Tn5 inszerció helyének lokalizálása DNS - DNS hibridizációval



a/ Eckhardt gél; b/ hibridizáció a pHM5 plazmid DNS-sel
1. ZB273; 2. ZB277; 3. ZB313; 4. AK631

A hibridizációs próba aktivitása 3×10^6 cpm volt, a röntgen kép 3 napos expozícióval készült.

A 9. ábrán bemutatott kísérlet alapján megállapítottam, hogy a ZB273, ZB277 törzsekben a Tn5 a pRme41b plazmidba épült be, a ZB313-ban pedig, mivel a Tn5 egyik *R.meliloti* 41 plazmidhoz sem hibridizál, a kromoszómára lokalizálható. /A kromoszómális eredetű DNS csak lineáris szakaszok formájában, kis mennyiségben van jelen az Eckhardt gélen, ezért nem mutatható ki hozzá hibridizáció. A gél tetején



látható erős hibridizáció azonban arra utal, hogy a Tn5 szekvencia jelen van a ZB313-as törzsben is./

A kísérletet 14 transzpozíciós mutagenézis után izolált szimbiózisban hibás mutánssal elvégezve megállapítottam, hogy :

1. A Tn5 a pRme41b plazmidra lokalizálható a ZB273, ZB274, ZB277, ZB278, ZB314, JA7 és AK1282 Fix⁻, valamint a ZB306, ZB310 Nod⁻ és a ZB78 Nod⁺, Fix⁺ /lásd: V. fejezet 2.2. pontja/ mutánsokban.
2. A Tn5 a kromoszómára lokalizálható a ZB313, ZB315, ZB316 és a TF178 Fix⁻, valamint a ZB308 Nod⁻ fenotípusu törzsekben.

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

1. Két nagy molekulásulyu plazmid a *R. meliloti* 41-ben

A *R. meliloti* 41-ben az Eckhardt-féle gélelektroforézissel a már Casse és munkatársai /1979/ által megfigyelt plazmid mellett egy eddig ismeretlen, > 300 Md-os plazmidot tudtam kimutatni. A plazmidokat pRme41a-nak /140 Md/ és pRme41b-nek /> 300 Md/ jelöltem.

A pRme41b-nek megfelelő elektroforetikus mobilitásu plazmid minden eddig általunk vizsgált *R. meliloti* törzsből /L5-30, GR4, 102F51, 2011/ jelen van /Bánfalvi és mtsai., 1981/. Más *Rhizobium* törzsekből is /*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*/ hasonló nagy méretű plazmidok mutathatók ki /1. táblázat/.

A pRme41b plazmidot több, nagy méretű plazmidok izolálására leírt módszert is kipróbálva, eddig még tiszta, cirkuláris DNS formájában izolálni nem tudtam /dolgozatban nem szereplő kísérletek/. Önálló plazmid voltára a következő indirekt bizonyítékok utalnak :

1. A hőkezeléssel előállított Nod⁻ mutánsokban deléció csak a pRme41b plazmidon mutatható ki, tehát az Eckhardt gélen látható kisebb mobilitásu DNS nem tekinthető a pRme41a plazmid OC formájának /6. ábra/.
2. A *R. meliloti* nif strukturgének csak a pRme41b-vel hibridizálnak /7. ábra/.
3. A *R. meliloti* L5-30 törzse Eckhardt gél alapján a pRme41b-vel azonos elektroforetikus mobilitásu plazmiddal is rendelkezik. Ebből a törzsből Rosenberg és munkatársai /1981/

a Swighamer /1980/ módszer módosításával a törzs 90 Md-os plazmidjával együtt a pRmeL5-30b plazmidot is izolálni tudták. A preparátum restrikciós enzimekkel történő emésztése után a 90 Md-os plazmidra jellemző csikozat mellett halvány háttér csikozat volt megfigyelhető.

2. Nod és Nif gének lokalizálhatók a pRme4lb plazmidra

A pRme4lb plazmid szimbiózis kialakításában szerepet játszó géneket hordoz, mivel :

1. a Nod⁻ mutánsok 30-40%-ában a pRme4lb plazmidon deléció mutatható ki;
2. a klónozott *R. meliloti* 41 nif strukturgének homológiát mutatnak a pRme4lb plazmiddal DNS - DNS hibridizációval.

Ezek az eredmények összhangban vannak más kutatócsoportok kísérleti eredményeivel is, amelyek alapján a *Rhizobiumok*ra általánosan jellemzőnek tűnik, hogy genetikai információjuk nagy része nagy molekulásulju plazmidok formájában van jelen a sejtben, s a plazmidok egyike szimbiózis kialakításáért felelős géneket hordoz /Sym plazmidok; II. fejezet 3.5. pontja/.

A nod és nif gének a pRme4lb plazmidon valószínűleg aránylag közel helyezkedhetnek el egymáshoz. 11 megvizsgált Nod⁻ mutáns közül 6-ban a deléció a nif génekre is kiterjed /6. táblázat/.

6. táblázat *R.meliloti* 41-ből származó szimbiózisban hibás mutánsok jellemzése

TÖRZS	KEZELÉS	FENOTIPUS	pRme41b elektroforetikus mobilitás-változás	nif régióban deléció
AK631	-	Fix ⁺	-	-
ZB121	hő	Nod ⁻	+	+
ZB125	hő	Nod ⁻	-	-
ZB126	hő	Nod ⁻	+	+
ZB138	hő	Nod ⁻	+	+
ZB147	hő	Nod ⁻	-	+
ZB157	hő	Nod ⁻	-	-
AK635	hő	Nod ⁻	-	-
AK641	hő	Nod ⁻	-	+
AK642	hő	Nod ⁻	-	+
GY561	fagyasztás	Nod ⁻	+	+
AK1212	spontán	Nod ⁻	-	+
ZB160	hő	Fix ⁻	n.v.	-
ZB163	hő	Fix ⁻	n.v.	-
ZB173	hő	Fix ⁻	n.v.	-

+ = változás, illetve deléció van; - = változás, illetve deléció nincs

n.v. = nem vizsgált;

A táblázat a dolgozatban szereplő kísérleteken kívül Vehary Sakanyan hibridizációs kísérleteinek eredményét is tartalmazza.

3. Hőkezeléssel a *R.meliloti* 41-ből szimbiózisban hibás, deléciós mutánsorozatot állítható elő

Hőkezeléssel a *R.meliloti* 41-ből R plazmidok 30-90%-os gyakorisággal törölhetők /II. fejezet 1.1.3. pontja/. Ennek alapján feltételezhető volt, hogy ez az eljárás alkalmas lesz a *R.meliloti* 41 endogén plazmidjainak törlésére is.

A hőkezelés elvégzése után izolált szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok vizsgálatával azonban ezt a feltételezést nem sikerült egyértelműen bizonyítani. Több mutánsról kimutatható volt, hogy bennük a hőkezelés hatására a pRme41b plazmidon nagy méretű deléció keletkezett, de olyan származékot, amelyben csak a pRme41a plazmid maradt volna fenn, az eddig megvizsgált törzsek között nem találtam. Ennek magyarázatára feltételezhetem :

1. A pRme41b plazmidon a baktérium számára életfontosságú génszakaszok találhatóak, így a plazmid teljes elvesztése együttjár a baktérium sejt pusztulásával.
2. Néhány törzsben, amely a pRme41b plazmidon nagy méretű deléciót hordoz, Eckhardt gélen az eredeti pRme41b plazmiddal megegyező elektroforetikus mobilitású halvány csík is megfigyelhető /6. ábra/. Lehetséges, hogy ez a csík a pRme41a plazmid OC formájának felel meg, de nem zárható ki annak lehetősége sem, hogy a *R. meliloti* 41-ben, a pRme41b-vel megegyező molekulásúlyú, harmadik plazmid is található, s ennek a plazmidnak jelenléte teszi lehetővé, hogy Eckhardt gél alapján megtaláljuk azokat a származékokat, amelyekből a pRme41b tökéletesen eliminálódott.

A hőkezeléssel izolált Nod⁻ mutánsok különbözőek, azaz a hőkezeléssel egy deléciós Nod⁻ mutánsorozatot sikerült előállítani. Ezt a következők bizonyítják :

1. A Nod⁻ mutánsoknak csak 30-40%-ában mutatható ki a pRme41b plazmidon deléció Eckhardt gélen, s ez a molekulásúly csökkenés is a különböző mutánsokban eltérő mértékű /6. ábra/.

2. A Nod^- mutánsok egy részében a nod génekkel együtt nif gének is elvesztek, a többiben a *R.meliloti* 41 nif génjeit hordozó pKJ243 DNS-sel deléció nem mutatható ki /6. táblázat/.
3. A *R.leguminosarum* pRL1-es plazmidja egy hőkezelésből származó törzsben képes a gümőképzés helyreállítására, míg az összes többi eddig vizsgált mutáns a pRL1 plazmid bevitele után is Nod^- fenotípust mutatott.
4. A hőkezeléssel izolált Nod^- mutánsok 80%-a hajszálgyökérgörbülést nem idéz elő a lucernán / Hac^- /, a többi Hac^+ fenotípust mutat, vagyis a különböző mutánsokban a szimbiózis kialakulásának különböző lépéseiben /II. fejezet, 2.2.1. pont/ mutatható ki változás, a Nod^- mutánsokból nem azonos génszakaszok veszték el, vagy működnek hibásan /Forrai Tamás kísérleteinek eredménye//7. táblázat/.

7. táblázat Genetikai változások 9 Nod^- mutánsban

Fenotípus \ Deléció mérete		Deléció mérete		
		Nagy	Kicsi	Nem látható
Hac^-	Nif^-	2	2	1
Hac^-	Nif^+	0	0	1
Hac^+	Nif^-	0	0	2
Hac^+	Nif^+	0	0	1

A hőkezeléssel tehát egy különböző géneket érintő, különböző méretű deléciót hordozó mutánsorozatot kaptunk. Az azonban, hogy ezek a deléciók egy pontból indulnak-e, vagy a pRme41b plazmid különböző helyein kezdődnek, az ed-

dig végzett kísérletek alapján még nem dönthető el.

A hőkezeléssel előállított szimbiózisban hibás mutáns-sorozatot, elsősorban a kis deléciót hordozó törzseket, alkalmasnak tartom a szimbiózis kialakításáért felelős gének részletesebb genetikai vizsgálatára, *R. meliloti*-ből származó rekombináns plazmidok komplementációs analízissel, vagy hibridizációs technikával történő tesztelésére is.

4. A *R. meliloti* 41 nod - nif régiójának instabilitása

A nod - nif régió elvesztése spontán is bekövetkezhet a *R. meliloti* 41-ben. Bár nem végeztünk olyan kísérletet, amelyből a spontán Nod⁻ és Fix⁻ mutánsok megjelenése gyakorisága pontosan megállapítható lett volna, de rendelkezünk olyan mutánsokkal, amelyek azt bizonyítják, hogy a nod - nif régió elvesztése nemcsak hőkezelés hatására következhet be. A GY561-es törzs "fagyasztás" után, az AK1212 spontán módon keletkezett deléciót hordoz ugyanabban a régióban /6. táblázat/. A ZB306, ZB310 Nod⁻ törzsekből, amelyeket a pJB4JI plazmiddal végzett mutagenézis után izoláltam, szintén hiányzik a nif régió /dolgozatban nem szereplő kísérleti eredmény/.

A nod - nif régió instabilitását lehet, hogy valamilyen IS /inszerciós szekvencia/, vagy az IS elemekhez hasonló *Rhizobium* szekvencia okozza. /A *R. meliloti* 2011-ben Ruvkun és mtsai., 1982; olyan IS szekvenciát tudtak kimutatni, amely nagy gyakorisággal a nif génekbe épül be./

A nod - nif régió instabilitása a ZB78 törzsben az AK631 vad típusu és kromoszómális /AK682, TF178/ vagy a pRme4lb plazmidon Tn5 inszerciót hordozó /JA7/ származékokhoz képest fokozott mértékű /3. táblázat/. Ez a fokozott instabilitás a ZB78 törzsben valószínűleg a Tn5 nod génekhez közeli DNS szakaszra történt beépülésével magyarázható. /A ZB78-ból a Tn5 elvesztése mindig Nod⁻ fenotípust eredményezett; 3. táblázat/.

5. A Tn5-tel jelölt szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok jellemzése

Tn5-tel jelölt szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok izolálására a Beringer és munkatársai /1978/ által előállított pJB4JI plazmidot használtam.

Szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokat 0,4% /Fix⁻/ és 0,1% /Nod⁻/ gyakorisággal kaptam. A Nod⁻ mutánsoknak a Fix⁻ mutánsokhoz képest alacsonyabb megjelenési gyakorisága lehet, hogy a Nod⁺ revertánsok növényi tesztben érvényesülő szelekciós előnyével magyarázható, aminek következtében több Nod⁻ mutánst is "elveszthettünk". Ezért az eltérő mutációs gyakoriságokból ebben az esetben nem következtethetünk a gümőképzésért felelős gének számára.

A transzpozíciós mutagenézissel izolált mutánsokban a Tn5 lokalizálását genetikai térképezéssel és hibridizációs technika segítségével végeztük. A szimbiózis kialakításában szerepet játszó gének elhelyezkedésére a Tn5 beépülési helyéből következtettünk azokban a törzsekben, ahol a Tn5 és a mutáns fenotípus között kapcsoltságot tudtunk kimutatni /8. táblázat/.



8. táblázat Tn5 inszerció lokalizálása szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokban

Törzs	Fenotípus	A mutáns fenotípus és a Tn5 kapcsoltsága	Tn5 inszerció lokalizálása		Mu-fág szekvencia
			Genetikai térképezéssel	Hibridizációval	
ZB273*	Fix ⁻	100%	nem kromoszómális	pRme41b	-
ZB274	Fix ⁻	100%	nem kromoszómális	pRme41b	pRme41b
ZB276	Fix ⁻	100%	n.v.	n.v.	kromoszóma
ZB277	Fix ⁻	100%	nem kromoszómális	pRme41b	-
ZB278	Fix ⁻	100%	n.v.	pRme41b	-
ZB313	Fix ⁻	100%	cys-46-tal kapcsolts	kromoszóma	-
ZB314	Fix ⁻	0%	n.v.	pRme41b	pRme41b
ZB315	Fix ⁻	0%	n.v.	kromoszóma	-
ZB316	Fix ⁻	0%	trp-15-tel kapcsolts	kromoszóma	kromoszóma
TF131	Fix ⁻	100%	gly-1-gyel kapcsolts	kromoszóma	kromoszóma
JA7	Fix ⁻	0%	n.v.	pRme41b	-
AK1282	Fix ⁻	100%	n.v.	pRme41b	
ZB306	Nod ⁻	100%	n.v.	pRme41b	pRme41b
ZB308	Nod ⁻	0%	n.v.	kromoszóma	kromoszóma
ZB310	Nod ⁻	0%	n.v.	pRme41b	pRme41b

*A Fix⁻ mutánsok genetikai vizsgálatát a munkacsoportunkban dolgozó Gursharan Randhawa végezte.

n.v. = nem vizsgált

Öt mutáns esetében a Tn5 inszerció és a szimbiotikus nitrogénkötésben hibás fenotípus között kapcsoltságot ki-mutatni nem tudtunk. Ezek spontán mutánsoknak tekinthetők, a nod - nif régió instabilitásának figyelembevételével va-lószínűleg ezek is a nod - nif régióban deléció-t hordozó mutánsok közé tartoznak.

A transzpozon beépülési helyére vonatkozóan a genetikai térképezéssel és hibridizációs technikával nyert adatok megegyezést mutattak. A transzpoziciós mutagenézissel izolált szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok vizsgálata további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a pRme41b plazmidon nod és fix gének találhatóak, illetve egyes kromoszómális régiók szintén szerepet játszanak az effektív nitrogénkötés kialakításában.

A Tn5-ös mutánsok vizsgálata során felfigyeltünk a pJB4JI plazmid használatának néhány hátrányára is :

1. A pJB4JI plazmidből aránylag nagy gyakorisággal keletkeznek deléciós származékok. Ezek képesek fennmaradni a *Rhizobium*ban és így a Km^R -t mutató transzkonjugánsoknak kb.: 80%-a tartalmazza csak a Tn5-t a *Rhizobium* genomba integrálódva. /V. fejezet 2.2. pont/
2. A pJB4JI-ből nagy gyakorisággal a Tn5-tel együtt Mu fág DNS is beépül a *Rhizobium* genomba /8. táblázat/.

Azok a fix::Tn5 mutánsok, amelyekbe a Tn5-tel együtt Mu fág DNS szekvencia nem épült be /ZB273, ZB277, ZB278, ZB313, AK1282/ kiindulópontot jelenthetnek egyes fix gének részletesebb vizsgálatához. A Tn5 antibiotikum rezisztenciájára szelektálva pl.: in vivo is előállíthatók lesznek szimbiotikus géneket hordozó R68.45 származékok. Ezeket az R'-okat aztán bevive különböző szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokba, alkalmasak lesznek a mutánsok komplementációs analízissel történő csoportosítására, illetve a *R. meliloti* 41 szimbiotikus gőnjeinek más Gram-negatív baktériumtörzsekbe való átvitelére.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám célja szimbiózis kialakításáért felelős gének lokalizálása volt *R.meliloti* 41-ben. Eredmények :

1. A *R.meliloti* 41-ben kimutattam egy eddig ismeretlen 300 Md-os /pRme41b/ plazmidot.
2. A *R.meliloti* 41 klónozott nif génjeivel végzett hibridizációs kísérletekkel bizonyítottam, hogy a nif strukturgéneket a pRme41b plazmid hordozza.
3. Hőkezeléssel és transzpozíciós mutagenézissel szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokat izoláltam.
4. Két hőkezeléssel előállított Nod⁻ mutáns genetikai térképezésével megállapítottam, hogy a mutáció nem lokalizálható a kromoszómára. A mutánsok egy részében nif génekre is kiterjedő különböző méretű deléciót mutattam ki a pRme41b plazmidon és ezzel bizonyítottam, hogy a nif géneken kívül nod gének is találhatóak a pRme41b plazmidon.
5. A transzpozíciós mutagenézissel izolált szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsokban a Tn5 beépülési helyét /pRme41b, illetve kromoszóma/ hibridizációval állapítottam meg. A mutánsok egy részében a Tn5-öt a pRme41b plazmidon mutattam ki, ami további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy számos nod és fix gén a pRme41b plazmidon található.

A hőkezeléssel és a transzpozíciós mutagenézissel előállított szimbiotikus nitrogénkötésben hibás mutánsok felhasználhatók a gümőképzésért és nitrogénkötésért felelős gének további, részletes genetikai és biokémiai vizsgálatára is.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

BÁNFALVI,Z., SAKANYAN,V., KONCZ,Cs., KISS,A., DUSHA,I., KONDOROSI,Á. /1981/: Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet., 184, 318-325.

BEDMAR,E.J., OLIVARES,J. /1980/: Autotransmissible resident plasmid of Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet., 177, 329-331.

BERINGER,J.E. /1974/: R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 84, 188-198.

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.

BERINGER,J.E., BEYNON,J.L., BUCHANAN-WOLLASTON,A.V., JOHNSTON,A.W.B. /1978/: Transfer of drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium. Nature, 276, 633-634.

BERINGER,J.E., HOGGEN,S.A., JOHNSTON,A.W.B. /1978/: Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R plasmid-mediated recombination. J. Gen. Microbiol., 104, 201-207.

BEYNON,J.L., BERINGER,J.E., JOHNSTON,A.W.B. /1980/: Plasmids and host range in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli. J. Gen. Microbiol., 120, 421-429.

BHUVANESWARI,T.V., PUEPPKE,S.G., BAUER,W.D. /1977/: Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. Plant Physiol., 60, 486-491.

BHUVANESWARI,T.V., BAUER,W.D. /1978/: The role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplante culture conditions on the soybean lectin-binding properties of rhizobia. Plant Physiol., 62, 71-74.

BIRNBOIM,H.C., DOLY,J. /1979/: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523.

BOLIVAR,F., RODRIGUEZ,R.L., GREENE,P.J., BETLACH,M.C., HEYNECKER,H.L., BOYER,H.W., ROSA,J.H., FALKOW,S. /1977/: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, 2, 95-113.

BOUCHER,C., BERGERON,B., BARATE de BERTALMIO,M., DÉNARIÉ,J. /1977/: Introduction of bacteriophage Mu into Pseudomonas solanacearum and Rhizobium meliloti using R factor RP4. J. Gen. Microbiol., 98, 253-263.

- BREWIN, N.J., BERINGER, J.E., BUCHANAN-WOLLASTON, A.V., JOHNSTON, A.W.B., HIRSCH, P.R. /1980/: Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 116, 261-270.
- BRILL, W.J. /1980/: Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiol. Rev., 44, 449-467.
- BUCHANAN-WOLLASTON, A.V., BERINGER, J.E., BREWIN, N.J., HIRSCH, P.R., JOHNSTON, A.W.B. /1980/: Isolation of symbiotically defective mutants of Rhizobium leguminosarum by insertion of transposon Tn5 into a transmissible plasmid. Mol. Gen. Genet., 178, 185-190.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE, J.R., PRIMROSE, S.B. /1974/: Chromosomal integration of Klebsiella nitrogen fixation genes in Escherichia coli. J. Gen. Microbiol., 80, 227-239.
- CANNON, F.C., RIEDEL, G.E., AUSUBEL, F.M. /1977/: Recombinant plasmid that carries part of nitrogen fixation /nif/ gene cluster of Klebsiella pneumoniae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2963-2967.
- CANNON, F.C., RIEDEL, G.E., AUSUBEL, F.M. /1979/: Overlapping sequences of Klebsiella pneumoniae nif DNA cloned and characterized. Mol. Gen. Genet., 174, 59-66.
- CASADESUS, J., OLIVARES, J. /1979/: Rough and fine mapping of Rhizobium meliloti chromosome. Mol. Gen. Genet., 174, 203-209.
- CASSE, F., BOUCHER, C., JULLIOT, J.S., DÉNARIÉ, J. /1979/: Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol., 113, 229-242.
- CLEWELL, D.B., HELINSKI, D.R. /1970/: Properties of supercoiled deoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. Biochemistry, 9, 4428-4440.
- CURRIER, T.C., NESTER, E.W. /1976/: Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem., 76, 431-441.
- DHAESE, P., DeGROE, H., DECRAEMER, H., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M. /1979/: Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in large Ti-plasmids of Agrobacterium tumefaciens. Nucl. Acids Res., 7, 1837-1849.
- DILWORTH, M.J. /1966/: Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations of Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta, 127, 285-294.

DIXON,R.A., POSTGATE,J.R. /1972/: Genetic transfer of nitrogen fixation genes. *Nature*, 239, 495-499.

DIXON,R.A. /1972/: Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Microbiol.*, 85, 193-201.

DIXON,R.A., CANNON,F.C., KONDOROSI,A. /1976/: Construction of P plasmid carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. *Nature*, 260, 268-271.

EADY,R.R., POSTGATE,J.R. /1974/: Nitrogenase. *Nature*, 249, 805-810.

ECKHARDT,T. /1978/: A rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 11, 584-588.

FISHER,R.J., BRILL,W.J. /1969/: Mutants of Azotobacter vinelandii unable to fix nitrogen. *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 99-105.

FORRAI,T., VINCZE,É., PLAZINSKI,J., BÁNFALVI,Z., KISS,G.B., KONDOROSI,A. /1982/: Genetic analysis of Rhizobium meliloti 41 mutants defective in symbiotic nitrogen fixation. *Proc. Int. Congr. Soil Biology* /in press/.

FORRAI,T., VINCZE,É., BÁNFALVI,Z., KISS,G.B., RANDHAWA,G., KONDOROSI,A. /1982/: Localization of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti. /manuscript/.

GIBSON,A.H., NUTMAN,P.S. /1960/: Studies on the physiology of nodule formation. VII. A reappraisal of the effect of preplanting. *Ann. Bot.*, 24, 420-433.

HAAS,D., HOLLOWAY,B.W. /1976/: R factor variants with enhanced sex factor activity in Pseudomonas aeruginosa. *Mol. Gen. Genet.*, 144, 234-251.

HELLING,R.B., GOODMAN,H.M., BOYER,H.W. /1974/: Analysis of endonuclease R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, 14, 1235-1244.

HIRSCH,P.R. /1979/: Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. *J. Gen. Microbiol.*, 113, 219-228.

HIRSCH,P.R., VAN MONTAGU,M., JOHNSTON,A.W.B., BREWIN,N.J., SCHELL,J. /1980/: Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of Rhizobium leguminosarum. *J. Gen. Microbiol.*, 120, 403-412.

JACOB,A.E., CRESSWELL,J.M., HEDGES,R.W. /1977/: Molecular characterization of the P group plasmid R68 and variant with enhanced chromosome mobilizing ability. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1, 71-74.

JOHNSTON,A.W.B., BERINGER,J.E. /1977/: Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature, 267, 611-613.

JOHNSTON,A.W.B., BEYNON,J.L., BUCHANAN-WOLLASTON,A.V., SETCHELL,S.J., HIRSCH,P.R., BERINGER,J.E. /1978/: High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature, 276, 634-636.

JOHNSTON,A.W.B., SETCHELL,S.M., BERINGER,J.E. /1978/: Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and Rhizobium meliloti: Formation of haploid recombinants and of R-primes. J. Gen. Microbiol., 10, 209-218.

KENNEDY,C., EADY,R.R., KONDOROSI,É., REKOSH,D.K. /1976/: The molybdenum-iron protein of Klebsiella pneumoniae nitrogenase. Evidence for nonidentical subunits from peptide mapping. Biochem. J., 155, 383-389.

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.

KISS,G.B., DOBÓ,K., DUSHA,I., BREZNOVITS,Á., OROSZ,L., VINCZE,É., KONDOROSI,Á. /1980/: Isolation and characterization of an R-prime plasmid from Rhizobium meliloti. J. Bacteriol., 141, 121-128.

KONDOROSI,Á., KISS,G.B., FORRAI,T., VINCZE,É., BÁNFALVI,Z. /1977/: Circular linkage map of the Rhizobium meliloti chromosome. Nature, 268, 525-527.

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.

LEEMANS,J., VILLARROEL,R., SILVA,B., VAN MONTAGU,M., SCHELL,J. /1980/: Direct repetition of a 1,2 Md DNA sequence is involved in site-specific recombination by the Pl plasmid R68. Gene, 10, 319-328.

LONG,S.R., MEADE,H.M., BROWN,S.E., AUSUBEL,F.M. /1981/: Transposon induced symbiotic mutants of Rhizobium meliloti. pp. 1129-1143 In N.J.Panapoulos /ed./, Genetic engineering in the plant sciences. Praeger, New York.

MacNEIL,T., MacNEIL,D., ROBERTS,G.P., SUPIANO,M.A., BRILL,W.J. /1978/: Fine-structure mapping and complementation analysis of nif /nitrogen fixation/ genes in Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 136, 253-266.

MacNEIL,D., BRILL,W.J. /1980/: Isolation and characterization of lambda specialized transducing bacteriophages carrying Klebsiella pneumoniae nif genes. J. Bacteriol., 144, 744-751.

MAIER,R.J., BRILL,W.J. /1976/: Ineffective and non-nodulating mutant strains of Rhizobium japonicum. J. Bacteriol., 127, 763-769.

MEADE,H.M., SIGNER,E.R. /1977/: Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 2076-2078.

MEADE,H.M., LONG,S.R., RUVKUN,G.B., BROWN,S.E., AUSUBEL,F.M. /1982/: Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriol., 149, 114-122.

NAGY,A. /1980/: A Tn5 transzpozon alkalmazása a Rhizobium meliloti 41-ben. /Szakdolgozat, JATE - SZBK/.

NUTI,M.P., LEPIDI,A.A., PRAKASH,R.K., SCHILPEROORT,R.A., CANNON,F.C. /1979/: Evidence for nitrogen fixation /nif/ genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature, 282, 533-535.

OROSZ,L., SVÁB,Z., KONDOROSI,Á., SIK,T. /1973/: Genetic studies on rhizobiophage 16-3. Genes and functions on the chromosome. Mol. Gen. Genet., 125, 341-350.

POSTGATE,J.R., KRISHNAPILLAI,V. /1977/: Expression of Klebsiella nif and his genes in Salmonella typhimurium. J. Gen. Microbiol., 98, 102-103.

PRAKASH,R.K., HOOYKAAS,P.J.J., LEDEBOAR,A.M., KIJNE,J., SCHILPEROORT,R.A., NUTI,M.P., LEPIDI,A.A., CASSE,F., BOUCHER,C., JULLIOT,J.S., DÉNARIÉ,J. /1980/: Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. pp. 139-163. In Nitrogen Fixation II. W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson /eds./ University Park Press, Madison.

RIEDEL,G.E., AUSUBEL,F.M., CANNON,F.C. /1979/: Physical map of chromosomal nitrogen fixation /nif/ genes of Klebsiella pneumoniae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 2866-2870.

RIGHBY,P.W.J., DIECKMANN,M., RHODES,C., BERG,P. /1977/: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase. J. Mol. Biol., 113, 237-255.

ROSENBERG,C., BOISTARD,P., DÉNARIÉ,J., CASSE-DELBART,F. /1981/: Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet., 184, 326-333.

ROSENBERG,C., CASSE-DELBART,F., DUSHA,I., DAVID,M., BOUCHER,C. /198 /: Megaplasmids in the plant-associated bacteria Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum. J. Bacteriol. /submitted/.

RUVKUN,G.B., AUSUBEL,F.M. /1980/: Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 191-195.

RUVKUN,G.B., AUSUBEL,F.M. /1981/: A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature, 289, 85-88.

RUVKUN,G.B., LONG,S.R., MEADE,H.M., VAN DEN BOS,R.C., AUSUBEL,F.M. /1982/: IsRm1: A Rhizobium meliloti insertion sequence which preferentially transposes into nitrogen fixation nif genes. /Manuscript/.

SHINNICK,T.M., LUND,E., SMITHIES,O., BLATTNER,F.R. /1975/: Hybridization of labelled RNA to DNA-cyanose gels. Nucl. Acids Res., 2, 1911-1929.

SOUTHERN,E.M. /1975/: Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503-518.

SCHUBERT,K.R., EVANS,H.J. /1976/: Hydrogen evolution: a major factor affecting efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1207-1211.

STREICHER,S.L., GURNEY,E.G., VALENTINE,R.C. /1972/: The nitrogen fixation genes. Nature, 239, 495-499.

TSAO,S.G.S., BRUNK,C.F., PEARLMAN,R.E. /1982/: Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. /Manuscript/.

VAN VLIET,F., SILVA,B., VAN MONTAGU,M., SCHELL,J. /1978/: Transfer of RP4::Mu plasmids to Agrobacterium tumefaciens. Plasmid 1, 446-455.

VINCZE,É. /1981/: Rhizobium meliloti kromoszómájának térképezése konjugációval. /doktori disszertáció, MTA SZBK/.

WU,T.T. /1966/: A model for three-point analysis of random general transduction. Genetics, 54, 405-410.

ZURKOWSKI,W., LORKIEWICZ,Z. /1978/: Effective method for isolation of non-nodulating mutants of Rhizobium trifolii. Genet. Res. /Camb./, 32, 311-314.

