

Rhizobium meliloti kromoszómájának térképezése
konjugációval

Irta:

Vincze Éva

Doktori disszertáció

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézetében, 1981-ben



Disszertációm a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készítettem. Köszönetet mondok Dr. Alföldi Lajos igazgató úrnak, hogy lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom kutatócsoportunk vezetőjének, Dr. Kondorosi Ádámnak, aki értékes elméleti és gyakorlati tanácsaival elindította és segítette munkámat, dolgozatomat átolvasta és kritikájával segítette. Köszönöm Dr. Kiss Györgynek, hogy kísérleti munkámmal és az eredmények kiértékelésével kapcsolatban mindig segítségemre volt, sokoldalú, értékes, baráti tanácsaival. Köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Koncz Csabának, Bánfalvi Zsófiának, Dr. Dusha Ilonának, Forrai Tamásnak és Dr. Sváb Zórának, akik nemcsak tanácsaikkal és kritikájukkal segítettek, hanem munkám épül az ő eredményeikre is. Külön köszönöm Bodó Klárának a kísérleti munkában végzett, fáradságot nem kimélő segítségét.



TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés.....	v.
2. Irodalmi áttekintés.....	1.
2.1. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció F-plazmidokkal	1.
2.2. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció F-től eltérő inkompatibilitásu plazmidokkal.....	3.
2.3. Genetikai térképezés parciális heterozigótákkal: kapcsoltsági analízis	4.
2.3.1. Kétpontos térképezés.....	4.
2.3.2. Hárompontos térképezés.....	4.
2.3.3. Kapcsoltsági függvény.....	5.
2.4. Perctérképezés és parciális diploidokkal végzett konjugációs térképezés.....	6.
2.5. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció <u>Rhizobiumok</u> ban.	6.
2.5.1. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció.....	7.
2.5.2. <u>Rhizobium</u> kromoszóma térképek.....	9.
2.6. In vivo és in vitro előállított R-prime-ok és kro- moszóma mobilizációs sajátosságai.....	10.
2.7. R-prime-ok alkalmazása a genetikai analízisben.....	13.
2.8. Célkitűzés.....	13.
3. Anyagok és módszerek.....	15.
3.1. A dolgozatban szereplő genetikai markerek és rövidítések.....	15.
3.1.1. Auxotrófia markerek.....	15.
3.1.2. Antibiotikus rezisztencia markerek.....	15.

3.1.3. Egyéb rövidítések.....	16.
3.2. Táptalajok és hígítók.....	16.
3.3. Baktériumtörzsek és plazmidok.....	17.
3.4. A baktériumok szaporítása.....	17.
3.5. Térképezés R68.45-ben lévő plazmíddal.....	17.
3.5.1. Konjugáció <u>Rhizobium</u> okban szilárd agar felületen..	17.
3.5.2. Keresztezés.....	18.
3.6. A nitrátreduktáz kimutatása.....	18.
3.7. R-plazmidok hőkurálása <u>R.meliloti</u> 41-ből.....	25.
4. Eredmények.....	26.
4.1. Új pontok lokalizálása <u>R.meliloti</u> 41 kapcsoltsági térképén.....	26.
4.2. Gyorstérképezési rendszer előállítása.....	46.
4.3. <u>R.meliloti</u> törzsek összehasonlítása gyorstérképezési rendszer felhasználásával.....	51.
4.4. <u>R.meliloti</u> 41 kromoszómális DNS darabot hordozó in vitro RP4-prime-ok kromoszóma mobilizációs képességé- nek vizsgálata <u>R.meliloti</u> 41-ben.....	51.
5. Az eredmények megvitatása.....	61.
5.1. R68.45 konjugációs rendszerrel való térképezés <u>R.</u> <u>meliloti</u> ban.....	61.
5.1.1. Módosított WU-képlettel számított additivitás <u>Rm</u> 41-ben.....	61.
5.1.2. A ritka rekombináns kategóriák előfordulása <u>R.me-</u> <u>liloti</u> 41-ben.....	64.

5.2.Gyorstérképezési rendszer kidolgozása <u>R.meliloti</u>	
41-ben.....	67.
5.2.1.Nem szelektálható fenotipusu mutációk térképezése..	68.
5.2.2.R-prime-ok felhasználása mutációk gyors lokalizá-	
lására.....	68.
6.Összefoglalás.....	70.
7.Felhasznált irodalom.....	71.

1. BEVEZETÉS

A nitrogén körforgásában kulcsszerepet játszanak a talajbaktériumok. Ezek közül is kiemelkednek a nitrogénkötő Rhizobiumok, melyek a pillangós virágú növényekkel /Fabales/ szimbiózisban képesek a levegő nitrogénjének megkötésére. Ebben a folyamatban a N_2 ammóniává redukálódik, mely egyrészt közvetlenül a gazdanövény nitrogénutánpótlását biztosítja, másrészt közvetve a talaj kötött nitrogéntartalmát növeli. A szimbiotikus nitrogénkötés nagy gazdasági jelentősége miatt e folyamat molekuláris biológiai vizsgálata az elmúlt években rendkívül intenzívvé vált. Ezekhez a kutatásokhoz kapcsolódott munkacsoportunk a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében. Célkitűzésünk a Rhizobium meliloti 41 szimbiotikus nitrogénkötésének molekuláris szinten való megismerése genetikai és biokémiai módszerek alkalmazásával, és a gyakorlati hasznosítási lehetőségek kutatása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció F-plazmidokkal.

A bakteriális genetikai vizsgálatoknak alapfeltétele olyan kísérleti rendszer létrehozása, mellyel genetikai információátvitelt tudunk megvalósítani. A genetikai kutatásokban az 1940-es évektől kezdve ismert és széles körben alkalmazott mechanizmus a konjugatív plazmiddal végzett genetikai információátvitel, melyet először Escherichia coli-ban írtak le /LEDERBERG és TATUM, 1946; LEDERBERG és mts., 1952; HAYES, 1952; 1953; CAVALLI és mts., 1953/. A konjugatív plazmidok közül legismertebb az E.coli F- /fertility/ plazmidnak nevezett szexfaktora. Ez a baktériumsejtben két formában: önálló extrakromoszómális részecskeként vagy kromoszómába integrálódva létezhet.

Az önálló F- faktor /F⁺/ két típusát ismerjük /CURTISS és RENSHAW, 1969/: az 1. típus nagy gyakorisággal, a 2. kis gyakorisággal képes beépülni a kromoszómába. Mindkettő képes plazmidot tartalmazó /donor/ sejtből átjutni a plazmidot nem tartalmazó /recipiens/ sejtbe. Az átjutás gyakorisága kb. 10^{-1} nagyságrendű, vagyis minden 10. recipiens sejt megkapja a plazmidot. Az átjutáskor kis valószínűséggel / 10^{-5} - 10^{-6} / a plazmiddal együtt a donor kromoszómájának egy-egy darabja is átjut a recipiens sejtbe. Ez az u.n. kromoszóma mobilizációs képesség /Cma = chromosome mobilization ability/. A kromoszóma mobilizáció mechanizmusa nem ismert. Feltételezik, hogy a plazmid és a kromoszóma között ideiglenes kapcsolat alakul ki a transzfer idejére és ehhez a 10^{-5} - 10^{-6} nagyságrendű kromoszóma mobilizációhoz a donor rekombinációs /rec Λ / funkciójának épsége szükséges /CLOWES és MOODY, 1966/. A rekombinációs, mechanizmusá-

ban hibás donor is képes 10^{-8} - 10^{-9} nagyságrendű kromoszóma átvitelre /CLOWES és MOODY, 1966; CHANDLER és KRISHNAPILLAI, 1974/. Ez a kis gyakoriságú átvitel magyarázható a nem transferábilis plazmidok mobilizációjára feltételezett mechanizmussal /SMITH és mts., 1963; EDWARDS és MEYNELL, 1969/, vagyis, hogy a kromoszóma mobilizációkor nem szükséges a kromoszóma és a plazmid közötti strukturális asszociáció kialakulása /CLOWES és MOODY, 1966; MOODY és HAYES, 1972/, de az alacsony átviteli gyakoriság oka lehet integrációs szekvenciákhoz kapcsolt rekombinációs folyamat is /illegitim rekombináció/.

Az integrálódott F-faktort tartalmazó törzseket Hfr /high frequency of recombination/ törzsnek nevezzük, mert a beépült F-faktor segítségével ezek képesek arra, hogy génjeiket nagy gyakorisággal /kb. 10^{-2} per recipiens sejt/ átjuttassák a recipiens sejtekbe. A sok ismert Hfr törzs más-más, törzsspecifikus helyen tartalmazza a beépült F-faktort. A Hfr törzsek kromoszóma mobilizációs tulajdonságai eltérnek az előzőekben ismertetett F-faktorétól: itt a részecske a kromoszóma transfer során mindig a disztális végen helyezkedik el, ezért a teljes F-faktor csak ritkán jut át a recipiens sejtbe. A kromoszóma mobilizációjának itt nem feltétele a rec A gén épsége /MOODY és HAYES, 1972/. Az integrálódott F-faktor cma mechanizmusát a "rolling circle" modell /GILBERT és DRESSLER, 1968/ segítségével magyarázzák. A recipiens sejtbe a donorból egy szálú DNS jut át. A donor kromoszómájának egyik szálát az F-faktor ori-T génjénél egy specifikus enzim /mob génnek diffuzibilis terméke/ felhasítja /CLARK és WARREN, 1979/. A bakteriális DNS egyik száláról új kópia szintetizálódik, mely az F-fak-

tor integrálódási helyétől függő méretű darabjával kezdődik /az először átjutó DNS darab mérete 45-62 kb között lehet; az F-faktor mérete 94,5 kb/, majd a bakteriális DNS, végül az F-faktor hiányzó része szintetizálódik.

2.2. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció F-től eltérő inkompatibilitású plazmidokkal.

A konjugatív plazmidokat inkompatibilitási csoportokba sorolják. Az egy inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok replikációs rendszere hasonló, ezért egy baktériumsejtben több, azonos inkompatibilitási csoportba tartozó plazmid nem képes stabilan fennmaradni. Az inkompatibilitás mellett a plazmidok másik fontos jellemzője, hogy milyen baktériumban, illetve baktériumokban képesek replikálódni /gazdaspecifitás/. Az egy inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok gazdaspecifitása hasonló. Az F-csoportba tartozó plazmidok pl. csak az E.coli-t és közelrokon fajokat fertőznek, más csoportok, pl. C, N, P, Q, W, stb. széles gazdaspecifitásúak.

A széles gazdaspecifitású plazmidok közül genetikai vizsgálatok szempontjából a P1 inkompatibilitási csoport R plazmidjai a legfontosabbak, mert közülük több plazmid transzferképessége mellett Cma^+ is. Feltételezhetően, a 2. típusú F-plazmidokhoz hasonlóan, igen kis gyakorisággal képesek integrálódni a kromoszómába, és az F-plazmidokhoz hasonlóan mutatják az integratív szupresszió jelenségét /egy hőmérsékletérzékeny plazmid, ha kromoszómába integrálódik, akkor magas hőmérsékleten a kromoszómával együtt replikálódik; NISHIMURA és mts., 1971; HOLLOWAY, 1979/. Az R plazmidok kromoszóma mobilizációját ma-



gyarázó elméletek, az F^+ plazmidéhoz hasonlóan, specifikus nukleotidszekvenciák kölcsönös jelenlétét tételezik fel a plazmidon és a kromoszómán /SHAPIRO és mts., 1977/.

2.3. Genetikai térképezés parciális heterozigótákkal: kapcsoltsági analízis.

2.3.1. Kétpontos térképezés.

Kromoszóma mobilizáció esetén a recipiensbe jutott donoreredetű kromoszómadarab a recipiens homológ régiójával párosodik és amennyiben az átjutott DNS darab genetikailag eltérő, a létrejött rekombinánsok kimutathatóak. A beépüléshez bakteriális rendszerben páros számú crossing over szükséges.

A genetikai térképezés alapjául az egyes tulajdonságok együttöröklődési gyakorisága szolgál. Két gén kapcsoltsága annál nagyobb, minél gyakoribb az együttöröklődésük. A gének kapcsoltsága és a fizikai távolság fordítottan arányosak.

Kétpontos térképezéskor, ha a donor genotípusa $\underline{a^+b^+}$, a recipiens genotípusa pedig $\underline{a\ b}$, $\underline{a^+}$ ill. $\underline{b^+}$ rekombinánsokra szelektálva a két allélpár kapcsoltságát / \underline{c} / megkapjuk, ha megállapítjuk

$$\frac{\sum \underline{a^+b^+}}{\sum \underline{a^+}} \quad \text{vagy} \quad \frac{\sum \underline{a^+b^+}}{\sum \underline{b^+}}$$

hányadosok értékét. A két allélpár annál közelebb van egymáshoz, minél közelebb van a hányados értéke 1-hez.

2.3.2. Hárompontos térképezés.

Két pont sorrendjének eldöntéséhez egy harmadik, referencia-pontot is figyelembe kell vennünk. Pl. $\underline{a^+b^+c^+}$ genotípusú donor $\underline{a\ b\ c}$ genotípusú recipiens keresztezésekor az egyik alléltre

szelektált rekombinánsok között megállapíthatjuk a másik két markerre kapott rekombinánsok számát. A legritkábban előforduló kategória a két szélső donor és a középső recipiens allélt tartalmazza /pl. $a^+b^-c^+$ /, és ez a ritka rekombináns kategória csak négyszeres crossing overrel jöhet létre. A fenti példából az is következik, hogy hárompontos keresztezésből csak akkor tudunk a génsorrendre következtetni, ha legalább az egyik szelektált donor allél szélső elhelyezkedésű.

2.3.3. Kapcsoltsági függvény.

WU /1966/ bevezetett egy függvényt, melynek segítségével a transzdukciós kapcsoltsági adatok additívá tehetők. Az általa leírt képlet $c = 1 - d'/l$, ahol

c = a két marker között mért kapcsoltság

d' = a két marker közötti fizikai távolság

l = a transzdukáló DNS átlagos hossza

A képlet megalkotásakor WU feltételezte, hogy a transzdukáló DNS megközelítőleg azonos méretű, és a kromoszómába random szakaszok épülnek be. A kapcsoltsági függvény általánosabbá tehető. KONDOROSI és mts. /1977/ a képletet $c = 1 - d/3$ alakúra módosították, ahol $d = d'/l$, d : az alkalmazott térképtávolság önkényes egységekben.

A módosított függvény alkalmazhatóságának feltétele, hogy az átjutott DNS darabok egységes méretűek legyenek, vagyis azonos kiterjedésű parciális diploid régió alakuljon ki. Konjugációs rendszerben a módosított képlettel kapott kapcsoltsági adatok additívá tehetők, és így megállapítható volt, hogy pl. R.meli-loti 41-ben az átjutó fragment átlagos hossza a kromoszóma $1/3$ -a /KONDOROSI és mts., 1977/.

2.4. Perctérképezés és parciális diploiddal végzett konjugációs térképezés

Az E.coli Hfr törzsei lehetőséget adnak a kromoszóma perctérképének elkészítésére. A teljes E.coli kromoszóma átjutása, Hfr donorokkal végzett keresztezésekben, 37°C-on 100 percig tart /BACHMANN, 1979/, s egy adott marker átjutási időpontja néhány perc pontossággal mérhető. A kromoszóma hossza 3×10^6 bázispár, így percenként kb. 30-35 ezer bázispárt kitevő DNS szakasz jut át, ami 30-35 átlagos méretű cisztronnak felel meg. A konjugáció során kialakult pilus rázásra törik, és így a folyamat bármely időpillanatban megszakítható. Elvben nem kell mást tenni, mint megmérni egy adott gén átjutásának időpontját.

A DNS átjutása az F-faktor beékelődési helyétől kezdődően törzsspecifikusan egyirányú és az adott törzsrre jellemző, hogy a beékelődési helytől jobbra vagy balra indul. Ebből az egyirányúságból következik, hogy az átjutási időpont ismerete elegendő egy gén térképhehelyzetének definiálásához.

A perctérképezés felbontóképességének határa tehát a percenként átjutó DNS szakasz mérete, vagyis csak egymástól ilyen vagy ettől nagyobb távolságra elhelyezkedő génekre alkalmazható. A módszer finomítására az ad lehetőséget, hogy a recipiens a konjugáció utáni rövid időben parciális diploid állapotban van és az utoljára bejutott markerre szelektálva a korábban átjutott markerek szétválását követő rekombinációs analízissel a markerek sorrendje megállapítható.

2.5. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció Rhizobiumokban.

Rhizobium fajokban több különböző típusú géntranszfert írtak le /transzformáció, transzfecció, transzdukció, konjugáció/.

Genetikai térkép készítésére a konjugációs rendszer a legalkalmasabb, ezért disszertációmban csak ezt a rendszert tárgyalom részletesebben.

2.5.1. Konjugáció és kromoszóma mobilizáció.

A Rhizobium törzsek egy vagy több plazmid DNS-t tartalmaznak, és néhány törzs esetében bizonyított, hogy a Rhizobium saját plazmid DNS-e képes konjugációra és géntranszferre. HEUMANN /1968/ leirt egy természetes, konjugációs rendszert R.lupini egy nodulációra képtelen törzsében. A szimbiotikus funkció hiánya miatt ez esetben azóta sem volt bizonyítható, hogy valóban R.lupini törzsről van szó. HIGASHI /1967/ R.trifolii akridin-orange kezeléssel nodulációban hibás, azaz gumót nem képző Nod⁻ mutánsokat izolált, és ki tudta mutatni nodulációs és gazdaspecifitási tulajdonságok átjutását R.trifolii-ből R.phaseoli-ba. Kromoszóma mobilizációt nem irt le.

COLE és ELKAN /1973/ R.japonicum R plazmidjának transzferét mutatták ki Agrobacterium tumefaciens-be. BEDMAR és OLIVARES /1980/ R.meliloti esetén mutatták ki egy 56,6 Md nagyságú plazmid transzferét, de a plazmid kromoszóma mobilizációs képességét nem vizsgálták. HIRSH /1979/ R.leguminosarum-ból mutatott ki egy konjugatív bakteriocin plazmidot, mely a bakteriocin termeléséért felelős géneken kívül nodulációs géneket is tartalmaz /JOHNSTON és mts., 1978a; BREWIN és mts., 1980/. Ez a plazmid 10^{-7} - 10^{-8} /recipiens sejt frekvenciával képes kromoszóma mobilizációra.

Rhizobium spp. természetes plazmidjai nem adtak lehetőséget a kromoszómális gének genetikai analizisére a kromoszóma mobi-

lizációs képesség hiánya vagy alacsony frekvenciája miatt. A probléma megoldását a P1 inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok felhasználása jelentette. Az R plazmidokat Pseudomonas aeruginosa egy törzsében találták, és ezek a plazmidok az eddig vizsgált Gram negatív baktériumok mindegyikébe átvihetők, így Rhizobium törzsekbe is /DATTA és mts., 1971; DATTA és HEDGES, 1972; BERINGER, 1974/. Az RP4 jelű plazmiddal kromoszóma mobilizációt mutattak ki R.leguminosarum 300 törzsben 10^{-9} frekvenciával /BERINGER és HOPWOOD, 1976/. R.meliloti 2011 törzsben 10^{-5} - 10^{-6} frekvenciával /MEADE és SIGNER, 1977/. Az RP4 plazmidnál általánosabban és effektívebben használható az R68.45 jelű plazmid, melyet HAAS és HOLLOWAY /1976/ izoláltak. Ez a plazmid az R68 jelű plazmid származéka, egy 1,5 Md méretű extra DNS darabot tartalmaz /JACOB és mts., 1977/. Ennek az 1,5 Md-os darabnak hasonló szerkezete van, mint a transzpozonoknak: egy 1,2 Md méretű, ismétlődő R68 plazmidból származó szekvenciából és egy 0,3 Md méretű, valószínűleg Pseudomonas aeruginosa eredetű kromoszómadarabból áll /LEEMANS és mts., 1980/.

Ez az R68.45 jelű plazmid számos fajban képes kromoszóma mobilizációra /Pseudomonas spp., E.coli, Rhodopseudomonas spheroides, Rhizobium spp./.. Ennek a plazmidnak a kromoszóma mobilizációs mechanizmusa nem ismert, valószínűleg kapcsolat létesül a plazmid és a kromoszóma között a mobilizáció során, de kromoszómába való stabil integrációját eddig nem sikerült kimutatni /HOLLOWAY, 1979; HOLLOWAY és mts., 1979/. Az R68.45 plazmid genetikai térkép készítésére jól használható. Ennek okai a követ-

kezők:

1. Az R68.45 plazmid a kromoszóma számos helyéről képes kromoszóma mobilizációt indítani és kb. azonos frekvenciával ad rekombinánsokat a legkülönbözőbb markerekre. Ez a frekvencia R.leguminosarum-ban 10^{-6} /donor sejt /BERINGER és mts., 1978/, R.meliloti-ban 10^{-3} - 10^{-5} /donor sejt /KONDOROSI és mts., 1977; CASADESUS és OLIVARES, 1978; KISS és mts., 1980/.
2. A kromoszóma nagy darabjait képes átjuttatni egyik sejtéből a másikba. R.leguminosarum esetén a kromoszóma átlag 15%-a, /BERINGER és mts., 1978/, R.meliloti-nál 30%-a /KONDOROSI és mts., 1977; KONDOROSI, 1977/ az egyszerre átjutó fragment.
3. A kapott rekombinánsok haploidok, a markerek stabilan öröklődnek, azaz szegregáció nem mutatható ki, és így a recesszív markerek is megnyilvánulnak.

2.5.2. Rhizobium kromoszóma térképek.

Konjugációs technikával eddig 4 Rhizobium törzsnek készült el a köralakú genetikai térképe. Mind a 4 esetben P1 inkompatibilitási csoportba tartozó plazmiddal történt a térképezés. Az RP4 plazmiddal szerkesztették meg a R.meliloti 2011 törzs térképét /MEADE és SIGNER, 1977/, az R68.45 plazmiddal készült a R.meliloti 41 /KONDOROSI és mts., 1977/, a R.meliloti GR4 /CASADESUS és OLIVARES, 1979/ és a R.leguminosarum 300 /BERINGER és mts., 1977/ törzsek térképe.

Az R68.45-ös kromoszóma mobilizációval a R.leguminosarum, a R.trifolii és R.phaseoli között haploid rekombinánsok gyakorlatilag ugyanolyan frekvenciával képződnek, mint fajon belül, így ezen gyorsan növekvő Rhizobium fajok kromoszómái közel



homológoknak tekinthetők /JOHNSTON és BERINGER, 1977/. Ugyanakkor a R.meliloti 41 és R.leguminosarum 300 törzsek között haploid rekombináns nem nyerhető, de a 2.3.3. pontban leírt módosított kapcsoltsági függvény segítségével a két Rhizobium törzs kapcsoltsági adatai additívá és összehasonlíthatóvá tehető /KONDOROSI és mts., 1980; BERINGER és mts., 1980/, és megállapítható, hogy a két Rhizobium törzs kromoszómáin a markerek elrendeződése hasonló.

2.6. In vivo és in vitro előállított R-prime-ok és kromoszóma mobilizációs sajátosságai.

Az F-plazmidok, amennyiben kovalensen integrálódott E.coli kromoszómadarabot hordoznak, megnövekedett gyakoriságú kromoszómatranszfert indítanak a homológ régióból /LOW, 1972/. Ennek analógiájára az R plazmidokból is előállíthatók olyan származékok, melyek pl. Rhizobium kromoszómadarabot hordoznak és ezekről is várható a homológ régióból indított megnövekedett gyakoriságú polarizált transzfer.

JACOB és mts. /1976/ in vitro előállítottak olyan RP⁴-prime-okat, melyek R.leguminosarum DNS darabokat hordoznak. Az RP⁴ plazmidot 3 restrikciós endonukleáz /BamHI, HindIII és EcoRI/ hasítja egy-egy helyen. JACOB és mts. az EcoRI hasítási helyre klónozták a R.leguminosarum DNS darabjait. Az általuk tesztelt két R-prime/a beépült fragment nagysága 5,1 ill. 2,5 Md/ nem adott megnövekedett kromoszóma mobilizációt R.leguminosarum 13 különböző auxotróf és 1 antibiotikum rezisztens törzsében.

JULLIOT és BOISTARD /1979/ RP⁴ vektor HindIII hasítási helyére klónozott R.meliloti 2011 törzs DNS-ének fragmentjeit. 16 RP⁴-

prime kromoszóma mobilizációs képességét tesztelték és 4 esetben tudtak kimutatni megnövekedett polarizált transzferképességet.

R-prime-ok in vivo módszerekkel is izolálhatók. HEDGES és mts. /1977/ donorként P.aeruginosa R68.44 tartalmú törzsét, recipiensként pedig E.coli trp auxotróf törzsét használták. E.coli trp⁺ alléljére szelektálva kis gyakorisággal /10⁻¹⁰ per recipiens sejt/ kaptak olyan prototróf telepet, melyből ki tudták mutatni egy R68.44 származék jelenlétét. Az R68.44 plazmidba épült Pseudomonas eredetű DNS-darab mérete 75,4 Md volt. HOLLOWAY /1978/ P.aeruginosa rec⁺ és P.aeruginosa rec⁻ argH törzsét keresztezte. A rec⁺ donor R68.45 plazmidot tartalmazott. Az argH⁺ prototróf telepek megjelenési gyakorisága 10⁻⁸ per recipiens sejt volt. Bizonyították azt is, hogy a prototrófiát az R68.45-prime eredményezte, mely az argH⁺ régiót kovalensen beépülve tartalmazta.

JOHNSTON és mts. /1978b/ szintén R68.45 R-prime-okat izoláltak, in vivo módszerrel. Donorként R.meliloti 2011, recipiensként R.leguminosarum törzseket használtak. Mivel a két Rhizobium törzs kromoszómája nem homológ, keresztezésükkel nem nyerhetők haploid rekombinánsok, de alacsony gyakorisággal olyan R68.45 származékok izolálhatók, amelyek R.meliloti 2011 DNS-ének egy darabját kovalensen beépülve hordozzák. Meghatározták a beépült fragmentek méretét, és ez a három vizsgált R-prime esetében eltérő volt /13, 23 és 43 Md/. Megállapították, hogy a Rhizobium DNS fragmentek az R68.45 plazmid két különböző helyére integrálódtak /JOHNSTON és mts., 1978b/. HU és mts. /1975/ hasonló megállapításra jutottak az F-prime plazmidok

vizsgálatakor. Ezekből a kísérletekből az a következtetés vonható le, hogy a plazmidokon egy meghatározott régió felelős a Cma^+ fenotípusért, és más plazmidszekvenciák is szerepet játszhatnak a kromoszóma-plazmid interakcióban R-prime létrejöttekor. Ezek a R.meliloti 2011 kromoszómafragmentet hordozó R-prime-ok megnövekedett polarizált transzfert mutatnak R.meliloti 41-ben /KONDOROSI és mts., 1980/, de R.leguminosarum-ban nem /JOHNSTON és mts., 1978b/.

KISS és mts. /1980/ feltételezték, hogy ilyen R-prime-ok a transzkonjugáns populációban spontán előfordulnak. Több keresztezésben azonos markerre szelektálva a már meglévő R-prime-ok feldúsíthatók. R.meliloti 41 törzsben R68.45 plazmiddal cys-46⁺ rekombinánsokra szelektáltak és ezeket a cys-46⁺ rekombinánsokat két egymást követő keresztezésben donorként használták. A második keresztezés után ki tudták mutatni, hogy az R68.45 hordozta kanamicin rezisztencia és az eredetileg kromoszómális cys⁺ tulajdonság erősen kapcsolatos. Ez az R68.45 származék /pGY1/ konjugáció során is stabil maradt, és a cys-46⁺ markeren kívül a cys-24 prototrófiát és a 16-3 Rhizobium fág attachment site-ját is hordozza. Az R68.45 plazmidba épült DNS mólsúlya 17,8 Md-nak adódott. A pGY1 megnövekedett géntanszfert mutatott a cys-46 régióból, a markerátvitel polarizált és az óra járásával ellentétes irányítottágú. Ugyanez az irányítottág figyelhető meg a R.meliloti 2011 törzsből származó R68.45-prime-ok esetében is /KONDOROSI és mts., 1980/. Így az eddig in vivo módszerekkel izolált Rhizobium DNS-t tartalmazó R-prime-ok mindegyike az óra járásával ellentétes irányban indit polarizált transzfert. Ez ellentétben áll az in

vivo előállított F-prime-oknál tapasztaltakkal. Az in vivo létrejött R-prime-ok között található olyan, amely az óra járásával megegyező, de olyan is, mely azzal ellentétes irányba indít polarizált transzfert. In vitro izolált R-prime-ok esetében mind R.meliloti 2011 törzsnél, mind R.meliloti 41 törzsnél nyerhetők olyan származékok, melyek vagy az óra járásával egyező, vagy azzal ellentétes irányban indítanak polarizált transzfert /JULLIOT és BOISTARD, 1979, jelen dolgozat/.

2.7.R-prime-ok alkalmazása a genetikai analízisben.

A teljes kromoszómát átfedő R-prime sorozat lehetővé teszi, hogy szupressziós /komplementációs/ analízissel ismeretlen mutációkat gyorsan és egyszerűen lokalizálhassunk a kromoszómán. Ugyancsak a gyors térképezést segíti elő az R-prime-ok homológ régióból indított, megnövekedett mértékű polarizált transzfer képessége. További lehetőség, amely szintén a polarizált transzfer képességgel kapcsolatos, a kapcsoltsági térképezési adatok finomítása. Konjugációs térképezéssel 80%-nál nagyobb kapcsoltságot mutató gének sorrendje már nem dönthető el. A térkép további finomítására már finom térképezési rendszerre /pl. transzdukció/ van szükség. Az R-prime-okkal kapott rekombinációs gyakoriságok azonban már ilyen kis kromoszómaszakaszon is egy nagyságrendnyi különbséget adnak. Ismerve az R-prime polarizált transzferének irányítottságát, a génsorrend megállapítható.

2.8.Célkitűzés.

Munkacsoportunk célja az, hogy Rhizobium meliloti-ban a szimbiotikus nitrogénkötésért felelős géneket lokalizáljuk.

Ennek érdekében szükséges volt további auxotrófia és rezisztencia markerek térképhehelyzetének megállapításával bővíteni a már meglevő R.meliloti kapcsoltsági térképet. Szükséges volt továbbá egy olyan konjugációs rendszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a nodulációban és a nitrogénkötésben hibás, vagyis nem szelektálható fenotípusú mutánsok térképezését.

A dolgozatnak egy másik célkitűzése volt a genetikai rendszer továbbfejlesztése in vitro előállított R-prime-ok alkalmazásával.

A dolgozatban szereplő kísérletek egy része olyan csoportmunka eredménye, melyben én is részt vettem. Ezt a megfelelő helyen többes szám első személy használatával jelzem.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A dolgozatban szereplő genetikai markerek és rövidítések.

3.1.1. Auxotrófia markerek.

Jelölések: pur - purin	cys - cisztein
met - metionin	pyr - pirimidin
arg - arginin	phe - fenilalanin
his - hisztidin	trp - triptofán
leu - leucin	glt - glutaminsav
gly - glicin	tyr - tirozin
pro - prolin	B ₁ - B ₁ vitamin

A purin- és pirimidinbázisokból 25 mikrogram/ml-t, az aminosavakból 50 mikrogram/ml-t használtam.

3.1.2. Antibiotikus rezisztencia markerek.

Rhizobium meliloti esetén használt antibiotikumok és koncentrációk /kromoszómális marker három betűvel, plazmid marker két betűvel rövidítve/:

str - streptomycin	250 mikrogram/ml
rif - rifampicin	100 "
nov - novobiocin	60 "
5FU - 5-fluoro-uracil	5 "
gen - gentamicin	200 "
cml - kloramfenikol	20 "
Km - kanamicin	400 "
Tc - tetraciklin	15 "

Escherichia coli esetén használt antibiotikumok és koncentrációk:

Km - kanamicin	30 mikrogram/ml
Tc - tetraciklin	15 "

Ap - ampicilin 100 mikrogram/ml

3.1.3. Egyéb rövidítések.

- att16-3 - a Rhizobium meliloti 41 16-3 fágjának
kötődési helye
- fix - a légköri nitrogén megkötésének képes-
sége szimbiózisban
- nod - gümőképző /nodulációs/ képesség
- tra - plazmidtranszfer gének
- cma - kromoszóma mobilizációs képesség
- nar - nitrát reduktáz enzimen hibás mutánsok

A dolgozatban ritkán előforduló jelölésekre DEMEREC és mts.
/1966/ által bevezetett rövidítéseket használom.

3.2. Táptalajok és higitók.

YTA: R.meliloti és E.coli számára egyaránt komplett
táptalaj.

Összetétele: élesztőkivonat /Difco/	1 g
trypton /Difco/	10 g
NaCl	5 g
1 M MgSO ₄	1 ml
1 M CaCl ₂	1 ml

desztillált vízzel 1000 ml-re ki-
egészíteni, pH=7,0. Szilárd táp-
talaj készítésekor kiegészítve 2%
agarral.

GTS: minimál táptalaj R.meliloti számára

Összetétele: $MgSO_4 \times 7 H_2O$	100 g
$CaCl_2 \times 6 H_2O$	220 g
K_2HPO_4	220 g
$FeCl_3$	20 g

A $FeCl_3$ -t 100 ml 0,1 N HCl-ban kell feloldani. Desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészíteni, pH=6,8. Szilárd táptalaj esetén kiegészítve 2% agarral.

Higitó: 0,9%-os NaCl oldat.

3.3. Baktériumtörzsek és plazmidok.

A felhasznált baktériumtörzsek adatai az 1. táblázatban, a plazmidokéi a 2. táblázatban szerepelnek.

3.4. A baktériumok szaporítása.

Inkubációs hőmérséklet: R.meliloti számára $30^{\circ}C$, E.coli számára $37^{\circ}C$. A tenyészetet levegőztetéssel szaporítottuk.

3.5. Térképezés R68.45-ben lévő plazmiddal.

3.5.1. Konjugáció Rhizobiumokban szilárd agar felületen.

A konjugációhoz késői logaritmusos fázisú /kb. 10^9 sejt/ml/ donorból és recipiensből összemértünk 0,1-0,1 ml-t YTA lemezre, majd $37^{\circ}C$ -os termosztátban 16 óra hosszat inkubáltuk. Ezután a baktériumokat a lemezről lekaparva fiziológiás sóoldatban szuszpendáltuk, és szelektív lemezre kiszélesztettük /GTS + megfelelő kiegészítés/. A plazmidtranszfert a kiszélesztésekor megállapított donor ill. recipiens sejtszámra vonatkoztatjuk.



3.5.2. Keresztezés.

A keresztezéseket szilárd agar felületen konjugációval végeztük. A keresztezett populációt szelektív lemezre szelgettük, meghatároztuk a donor, a recipiens és a transzkonjugánsok sejtszámát, a donor és recipiens markereinek reverziós gyakoriságát és a recipiens egyes markereire kapott rekombinációs gyakoriságot. Ellenszelekciós markerként a szelektált markerrel nem kapcsolt markert használtunk. A nem szelektált markereknek a szelektáltakkal történő átjutását a Lederberg-féle replikációs technikával /LEDERBERG és LEDERBERG 1952/ határoztuk meg.

3.6. A nitrátreduktáz kimutatása.

Reagens a nitrátreduktáz teszthez: /Griess-Ilosvay reagens, két komponens /A és B/ 1:1 arányú keveréke.

A komponens: 1 g szulfanilsav 100 ml 30%-os ecetsavban oldva

B komponens: 0,3 g alfa-naftilamin 70 ml kétszer desztillált vizben forralva, utána szürve és kiegészítve 30 ml ecetsavval.

A teszt leírása: A nitrátreduktáz működését a $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ átalakítás alapján, színreakcióval mutattuk ki. A vizsgálandó baktériumokat szilárd YTA táptalajra kicsikoztuk, 10mM NaNO_3 oldattal benedvesített szűrőpapírral légmentesen lefedtük. 15 percig szobahőmérsékleten tartottuk a lemezeket, majd 1 ml Griess-Ilosvay reagenst öntöttünk rá. A megpirosodott telepek aktiv nitrátreduktáz enzimmel rendelkeznek /KISS és mts., 1979/.

1.táblázat. A dolgozatban szereplő mikroorganizmusok jegyzéke.

Rhizobium meliloti 41 törzsek

Törzs jele	Markerei	Forrás
Rm41	vad	Dr.Szende Kálmán
AK74	<u>his-1 str-1</u>	AK245 spontán mutáns
AK80	<u>cys-46</u>	Kondorosi és mts.1974
AK168	<u>cys-46 str-3</u>	AK80 spontán mutánsa
AK171	<u>pu -1 met-331 str-2</u>	AK212 NTG mutagenézis
AK173	<u>pur-1 pyr-29 str-2</u>	AK212 NTG "
AK176	<u>cys-46 gly-1 str-3</u>	AK168 NTG "
AK177	<u>cys-46 his-210 str-2</u>	AK168 NTG "
AK180	<u>cys-46 pur-3 str-3</u>	AK168 NTG "
AK181	<u>pyr-1 his-210 str-2</u>	AK212 NTG "
AK184	<u>cys-46 gly-1 leu-4 str-3</u>	AK176 NTG "
AK185	<u>cys-46 gly-1 pur-4 str-3</u>	AK176 NTG "
AK193	<u>cys-46 gly-1 pur-4 met-2</u>	AK185 NTG "
AK194	<u>cys-46 gly-1 pur-4 tyr-1 str-3</u>	AK185 NTG "
AK196	<u>cys-46 gly-1 pur-4 pyr-1 str-3</u>	AK185 NTG "
AK200	<u>pur-1 his-210 pyr-2 str-2</u>	AK181 NTG "
AK207	<u>his-1 str-1 rif-1</u>	AK74 spontán mutánsa
AK208	<u>his-1 str-1 /R68.45/</u>	PA025+AK74→ → Km ^R Tc ^R AK74
AK209	<u>pur-1 pyr-29 str-2 /R68.45/</u>	AK208+AK173→ → Km ^R Tc ^R AK173
AK212	<u>pur-1 str-2</u>	Dr.Sváb Zóra
AK213	<u>his-1 str-1 rif-1 cml-2</u>	AK207 spontán mutánsa
AK239	<u>cys-16</u>	Rm41 NTG mutagenézis

1.táblázat, folytatás

Törzs jele	Markerei	Forrás
AK240	<u>cys-10</u>	Rm41 NTG mutagenézis
AK245	<u>his-1</u>	Dr.Orosz László
AK249	<u>trp-6 str-8</u>	Dr.Sváb Zóra
AK250	<u>trp-7 str-8</u>	Dr.Sváb Zóra
AK311	<u>cys-46 gly-1 leu-4 str-35FU-2</u>	AK184 spontán mutánsa
AK354	<u>narB-15 phe-15 str-6</u>	GY43 spontán mutánsa
AK357	<u>narA-168 met-168 str-5</u>	GY39 spontán mutánsa
AK462	<u>gly-1 pyr-29 str-2</u>	EV80 kurált származéka
AK495	<u>cys-46 gly-1 phe-15 str-3</u>	EV79 kurált származéka
AK514	<u>cys-46 met-331 gly-1 str-3</u>	GY98 kurált származéka
AK532	<u>cys-46 gly-1 pyr-29 str-3</u>	EV81 kurált származéka
AK550	<u>gly-1 leu-4 phe-15 str-3</u>	EV102 kurált származéka
AK551	<u>his-210 leu-4 str-3</u>	EV104 kurált származéka
AK631	vad, kompakt	Rm41 kompakt változata
AK684	vad, kompakt, <u>str-7</u>	AK631 spontán mutánsa
AK766	<u>pyr-24 :Tn5</u>	Rm41 Tn5 mutagenézis
AK854	<u>cys-46 pur-3 str-3 rif-2</u>	AK180 spontán mutáns
GY39	<u>narA-168 met-168</u>	GY152 NTG mutagenézis
GY41	<u>narA-168 pur-168</u>	GY152 NTG mutagenézis
GY42	<u>narA-168 trp-168</u>	GY152 NTG mutagenézis
GY43	<u>narB-15 phe-15</u>	GY154 NTG mutagenézis
GY44	<u>narB-15 pur-15</u>	GY154 NTG mutagenézis
GY45	<u>narB-15 trp-15</u>	GY154 NTG mutagenézis
GY75	<u>narA-168 met-168 /R68.45/</u>	AK208+GY39→

→ Km^R Tc^R GY39

1. táblázat, folytatás

Törzs jele	Markerei	Forrás
GY81	<u>narB-15</u> <u>phe-15</u> /R68.45/	AK208+GY43→ → Km ^R Tc ^R GY43
GY83	<u>narB-15</u> <u>pur-15</u> /R68.45/	AK208+GY44→ → Km ^R Tc ^R GY44
GY141	<u>cys-46</u> <u>tyr-1</u> <u>str-3</u> /R68.45/	AK208+AK194→ → <u>gly-1</u> ⁺ <u>pur-4</u> ⁺ re- kombináns
GY144	<u>gly-1</u> <u>leu-4</u> <u>str-3</u>	AK184 cys-46 ⁺ revertáns
GY152	<u>narA-168</u>	Rm41 NTG mutagenézis
GY154	<u>narB-15</u>	Rm41 NTG mutagenézis
GY493	<u>cys-46</u> <u>phe-15</u> <u>str-3</u>	AK495 <u>gly-1</u> ⁺ revertánsa
GY502	<u>leu-4</u> <u>phe-15</u> <u>str-3</u>	AK550 <u>gly-1</u> ⁺ revertánsa
EV20	<u>leu-6</u> <u>str-3</u> /R68.45/	GY81+EV55→ → Km ^R Tc ^R EV55
EV23	<u>pur-1</u> <u>his-210</u> <u>pyr-2</u> <u>str-2</u>	GY141+AK200→ → Km ^R Tc ^R AK200
EV31	<u>his-1</u> <u>str-1</u> <u>rif-1</u> <u>cml-2</u> /68.45/	GY81+AK213→ → Km ^R Tc ^R AK200
EV38	<u>cys-46</u> <u>gly-1</u> <u>pyr-1</u> <u>str-3</u>	AK196 <u>pur-4</u> ⁺ revertánsa
EV39	<u>gly-1</u> <u>pyr-1</u> <u>str-3</u>	EV38 <u>cys-46</u> ⁺ revertánsa
EV55	<u>leu-6</u> <u>str-3</u>	AK177 <u>cys-46</u> ⁺ revertánsa
EV62	<u>narB-15</u> <u>trp-15</u> <u>str-4</u>	GY45 spontán mutánsa
EV64	<u>his-210</u> <u>pyr-2</u> <u>str-2</u>	AK200 <u>pur-1</u> ⁺ revertánsa
EV69	<u>narA-168</u> <u>trp-168</u> <u>str-9</u>	GY42 spontán mutánsa

1.táblázat, folytatás

Törzs jele	Markerei	Forrás
EV74	<u>cys-46 leu-4 str-3</u> /R68.45/	TF7+AK184 → → <u>gly-1</u> ⁺ rekombinánsa
EV79	<u>cys-46 gly-1 phe-15 str-3</u> /R68.45/	GY81+AK184 → <u>leu-4</u> ⁺ <u>phe-15</u> rekombináns
EV80	<u>gly-1 pyr-29 str-3</u> /R68.45/	AK209+AK184 → → <u>cys-46</u> ⁺ <u>pyr-29</u> <u>leu-4</u> ⁺ rekombinánsa
EV81	<u>cys-46 gly-1 pyr-29 str-3</u> /R68.45/	AK209+AK184 → → <u>leu-4</u> ⁺ <u>pyr-29</u> rekombináns
EV82	<u>narB-15 trp-15</u> /R68.45/	GY141+GY45 → → Km ^R Tc ^R GY441
EV85	<u>narB-15 trp-15 str-4 5FU-3</u>	EV62 spontán mutánsa
EV86	<u>cys-46 gly-1 pyr-1 str-3</u>	AK194 <u>pur-4</u> ⁺ reveránsa
EV88	<u>narB-15 trp-15 gent-2</u>	GY45 spontán mutánsa
EV91	<u>cys-46 gly-1 leu-4 str-3</u> /R68.45/	TF7+AK184 → → Km ^R Tc ^R AK184
EV96	<u>trp-7 str-4</u> /R68.45/	GY83+AK250 → → Km ^R Tc ^R AK250
EV102	<u>gly-1 leu-4 phe-15 str-3</u> /R68.45/	GY81+AK184 → <u>cys-46</u> ⁺ <u>phe-15</u> rekombináns
EV104	<u>his-210 leu-4 str-3</u> /R68.45/	EV23+GY144 → <u>gly-1</u> ⁺ <u>his-210</u> rekombináns
EV106	<u>cys-46 gly-1 phe-15 str-3 gent-3</u>	AK495 spontán mutánsa
EV107	<u>his-1 5FU-1</u>	AK245 spontán mutánsa

1. táblázat, folytatás

Törzs jele	Markerei	Forrás
EV112	<u>his-1</u> <u>5FU-1</u> /R68.45/	EV91+EV107 → → Km ^R Tc ^R EV107
EV113	<u>narA-168</u> <u>trp-168</u> /R68.45/	EV91+GY42 → → Km ^R Tc ^R GY42
EV119	<u>cys-46</u> <u>rif-3</u>	AK80 spontán mutánsa
EV127	<u>cys-46</u> <u>rif-3</u> /R68.45/	EV112+EV119 → → Km ^R Tc ^R EV119
EV139	<u>pur-19</u> <u>str-10</u>	JH19 spontán mutánsa
EV180	<u>gly-1</u> <u>pur-4</u> <u>trp-15</u> <u>str-3</u> /R68.45/	
EV184	<u>gly-1</u> <u>pur-4</u> <u>met-2</u> <u>str-3</u>	AK193 <u>cys-46</u> ⁺ revertánsa
EV196	<u>cys-46</u> <u>phe-15</u> <u>str-3</u> <u>rif-4</u>	GY493 spontán mutánsa
EV197	<u>leu-4</u> <u>phe-15</u> <u>str-3</u> <u>rif-5</u>	GY502 spontán mutánsa
EV199	<u>gly-1</u> <u>leu-4</u> <u>str-3</u> <u>rif-6</u>	GY144 spontán mutánsa
EV207	<u>gly-1</u> <u>pur-4</u> <u>trp-15</u> <u>str-3</u> <u>rif-7</u> /R68.45/	EV180 spontán mutánsa
EV218	<u>his-1</u> <u>str-7</u> <u>5FU-1</u> <u>nov-1</u> /R68.45/	EV112+AK684 <u>nov-1</u> spontán mutánsa → <u>his-1</u> <u>5FU-1</u> rekombináns
EV261	<u>leu-44</u> <u>str-10</u>	JH44 spontán mutáns
EV281	<u>pyr-24</u> :Tn5 /pJB3JI/	AK1072+AK766 → → Tc ^R AK766
JH44	<u>leu-44</u>	Dr. Horváth Judit
JH19	<u>pur-19</u>	Dr. Horváth Judit
TF7	<u>pur-1</u> <u>met-331</u> <u>str-2</u> /R68.45/	AK208+AK171 → → Km ^R Tc ^R AK171
ZB178	<u>narB-15</u> <u>pur-15</u> <u>rif-8</u>	GY44 spontán mutánsa

1. táblázat, folytatás

Törzs jele	Markerei	Forrás
ZB201	<u>cys-46 rif-3 5FU-4</u>	EV119 spontán mutánsa
ZB205	<u>narB-15 pur-15 rif-8 5FU-5</u>	ZB178 spontán mutánsa
ZS314	<u>narB-15 trp-15 str-4 5FU-3 rif-9</u>	EV85 spontán mutánsa
<u>Egyéb baktériumtörzsek</u>		
<u>R.meliloti</u> 2011		
AK624	<u>str</u>	Dr.H.Meade
EV204	<u>his-1 str 5FU-1 /R68.45/</u>	EV112+AK624 → <u>his-1</u> <u>5FU-1</u> rekombináns
<u>Escherichia coli</u> K-12		
HB101	<u>hvr⁻ hsm⁻ pro⁻ gal⁻ str⁻ su⁺ leu⁻ Bl⁻ lacY</u>	
AK1072	<u>pro⁻ met⁻ nal</u> /pJB3JI/	Dr.J.E.Beringer
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
PA025	<u>leu-10 argF-10 /R68.45/</u>	Prof.B.W.Holloway

2. táblázat. A dolgozatban használt plazmidok.

Jelölés	Markerek	Forrás
RP4	Km ^R Tc ^R Carb ^R P inkomp.	Dr.R.A.Dixon
R68.45	Km ^R Tc ^R Carb ^R Cma ⁺ P inkomp.	Prof.B.W.Holloway
pJB3JI	Tc ^R Carb ^R Cma ⁺ P inkomp.	Dr.J.E.Beringer

3.7. R-plazmidok hőkúrálása R.meliloti 41-ből.

R típusú plazmidok eliminálására a plazmidtartalmú törzseket $39,5^{\circ}\text{C}$ -on növesztettük. Ez a hőmérséklet szubletális a R. meliloti számára és a generációs idő kétszeresére nő. 20-25 generáció után a populáció 25-90%-ból /az érték törzsenként változó/ elveszik a plazmid. A plazmidvesztés egyszerű replikatechnikával kimutatható. A kúrált törzsek jól használhatók a további keresztezésekben recipiensként.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Uj pontok lokalizálása R.meliloti 41 kapcsoltsági térképén.

A R.meliloti 41 kapcsoltsági térképét egy konjugatív, kromoszóma mobilizációs képességgel rendelkező R68.45 jelű plazmidal szerkesztettük meg. A plazmid átjutási gyakorisága a donor sejtből a recipiens sejtbe 10^{-1} - 10^{-2} nagyságrendű volt. A rekombinációs gyakoriság a legkülönbözőbb markerek esetén 10^{-4} - 10^{-5} nagyságrendűnek adódott /recipiens sejtire számolva/. Ez utóbbiból az is következik, hogy az R68.45 jelű plazmid a kromoszóma sok pontjáról képes mobilizációt indítani, és azt is tudjuk, hogy viszonylag nagy kromoszómadarabokat képes átjuttatni egyik sejtől a másikba. Két pont átjutási gyakorisága, vagyis kapcsoltsága és a közöttük lévő távolság fordítottan arányos. A kapcsoltsági értékek a módosított WU-képlettel additívvé tehetők. Az alkalmazott képlet: $\underline{d}=1-\sqrt[3]{\underline{c}}$, ahol \underline{c} = a kísérletben mért kapcsoltság, \underline{d} =térképtávolság.

Az 1.ábrán az R.meliloti 41 genetikai térképe látható. Diszszertációmban a bekeretezett pontok térképezését tárgyalom.

A pur-19 pont térképezési adatait a 3. táblázat tartalmazza, melynek alapján a pur-19 a cys-46 str régióba térképezhető./Mivel a függetlenül izolált streptomycin rezisztens mutációk, str-1 től str-10-ig, a kromoszóma egyazon helyére térképeződnek, a továbbiakban csak cys-46 str, pur-15 str stb. régióról beszélek./ A pyr-1 és pyr-2 auxotrófokkal a pyr-29 auxotrófiával nem nyerhető rekombináns utód, és a pyr-1 és pyr-2 keresztezési adatai megegyeznek a pyr-29 adataival.

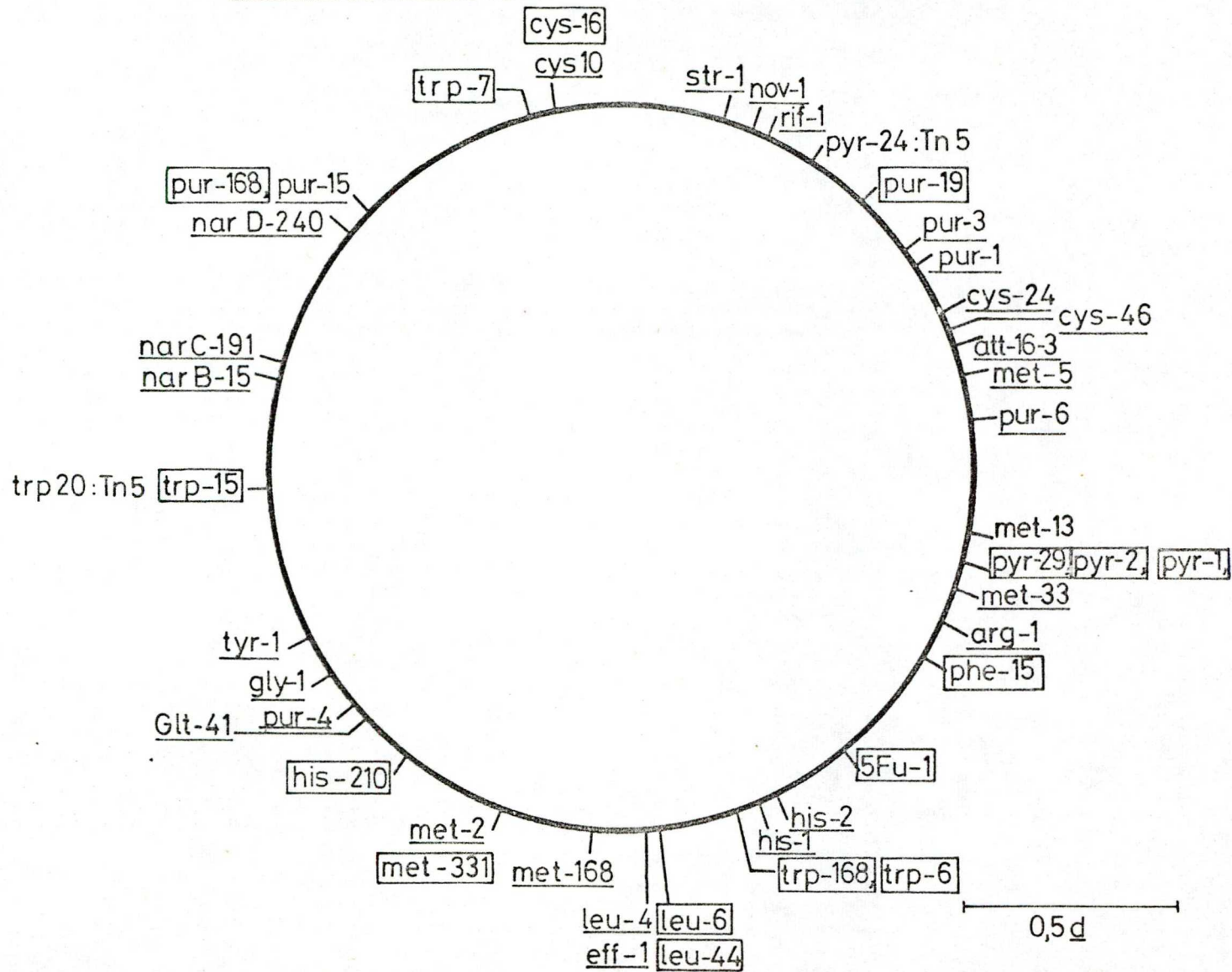
A phe-15 auxotrófia lokalizálását a 4. és 5. táblázat keresztezései tüntetik fel, az 5-FU-1 rezisztencia térképezési adatai

pedig a 4., 5. és 6. táblázatokban láthatók. Ezek alapján a térképsorrend cys-46 pyr-29 phe-15 5FU-1 his-1 leu-4.

A trp-6 és trp-168 jelű mutánsok az R68.45 konjugációs keresztezési rendszer szintjén nem különíthetők el. A kapcsoltsági térképen való lokalizálásukat a 6. táblázat tartalmazza, melynek alapján a his-1 és leu-4 pontok közé térképezhető. A leu-6 és leu-44 a leu-4-től különböző auxotrófiák, mert leu-4 auxotrófiát hordozó donorral rekombináltathatók, de a leu-4 közelében helyezkednek el, mert a leu-4 marker jelenléte erősen csökkenti rekombinációs gyakoriságukat. Pontos lokalizálásuk adatait a 7. táblázat keresztezései tartalmazzák. Ennek alapján a sorrend his-1 leu-44 leu-6 leu-4 met-168. A met-331 nem azonos a met-168 jelű metionin auxotrófia alléllal és a 8. táblázat adataiból következően a sorrend his-1 leu-4 met-168 met-331 gly-1. A his-210 jelű auxotrófia szintén a leu-4 gly-1 régióba térképeződik /9.táblázat/, kapcsoltsági adatok alapján a sorrend ezen a szakaszon leu-4 met-168 met-331 his-210 gly-1. A trp-15 auxotrófia a tyr-1 pur-15 között foglal helyet /10. táblázat/. A pur-168 a str rezisztenciával mutat kapcsoltságot. Az 11. táblázaton feltüntetett helyét a pEV420 RP4-prime-mal végzett kísérletek teszik jogossá / ld. 17. táblázat/. A trp-7 a 11. táblázat adatai alapján a pur-15 str régióban van. A cys-16 auxotrófiát hordozó mutáns is ebbe a régióba lokalizálható. A kapcsoltsági adatok a pur-15 trp-7 cys-16 str sorrendet valószínűsítik /12.táblázat/.

A 2. ábrán összefoglaltam az általam térképezett pontok kapcsoltsági adatait "d" értékben kifejezve.

A *Rhizobium meliloti* kapcsoltsági térképe



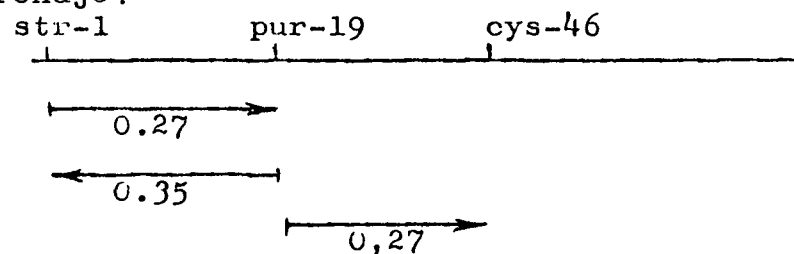
I. ábra

A markerek közötti távolság d értékben kifejezve

3. táblázat. A pur-19 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/szelektált marker	A rekombi- nások nem szelektált osztályai	Telep szám	Markerpárok	kapcsolt- sága /c/	térkép- távolsá- ga /d/
EV91	JH19	<u>cys-46 gly-1 leu-4/pur-19⁺</u>	<u>str-3⁺</u>	65	<u>pur-19⁺ str-3</u>	0,27	0,35
			<u>str-3</u>	26			
		<u>cys-46 gly-1 leu-4/str-3</u>	<u>pur-19</u>	43			
			<u>pur-19⁺</u>	28	<u>str-3 pur-19⁺</u>	0,39	0,27
<u>gly-1 leu-4/pur-19⁺</u>	<u>cys-46</u>	10					
	<u>cys-46⁺</u>	16	<u>pur-19⁺ cys-46</u>	0,39	0,27		

Markerek sorrendje:



telepszám: a megvizsgált telepek száma pl. a pur-19⁺ rekombinások között /91 telep/
Lederberg-féle replikációs technikával megállapítottam a str-3⁺ /65 te-
lep/ és str-3 /26 telep/ genotípusú telepek számát

c: a markerpárok kapcsoltsági gyakorisága

d: additív térképtávolság a markerpárok között /önkényes egységekben/ $d=1-\frac{3}{c}$
- /Kondorosi és mts., 1977/

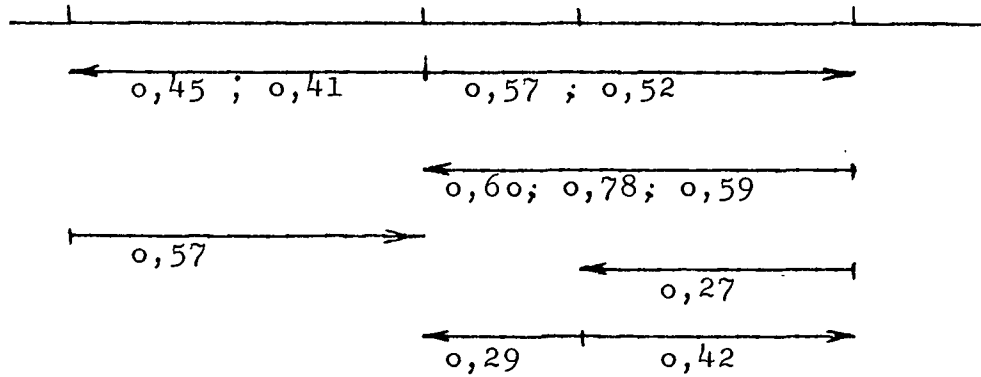
4. táblázat. A phe-15 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága, c	térkép- távol- sága, d
GY81	AK184	<u>str-3/leu-4⁺</u>	<u>cys-46 gly-1 phe-15</u>	29	<u>leu-4⁺ phe-15</u>	0,08	0,57
			<u>cys-46⁺ gly-1 phe-15⁺</u>	364			
		<u>str-3/cys-46⁺</u>	<u>gly-1 leu-4 phe-15</u>	8	<u>cys-46⁺ phe-15</u>	0,05	0,60
			<u>gly-1 leu-4 phe-15⁺</u>	147			
EV127	AK550	<u>str-3/phe-15⁺</u>	<u>cys-46 gly-1 leu-4</u>	8	<u>phe-15⁺ cys-46</u>	0,08	0,57
			<u>cys-46⁺ gly-1 leu-4⁺</u>	21	<u>phe-15⁺ leu-4⁺</u>	0,21	0,41
		<u>str-3/leu-4⁺</u>	<u>cys-46⁺ gly-1⁺ phe-15</u>	9	<u>leu-4⁺ gly-1⁺</u>	0,03	0,68
			<u>cys-46 gly-1 phe-15⁺</u>	46	<u>leu-4⁺ phe-15⁺</u>	0,17	0,45
			<u>cys-46⁺ gly-1 phe-15</u>	221			
GY83	EV106	<u>pur-15 str-3/phe-15⁺ cys-46 gly-1</u>	<u>cys-46⁺ gly-1</u>	37	<u>phe-15⁺ cys-46⁺</u>	0,11	0,52
				4			
		<u>pur-15 str-3/cys-46⁺ gly-1 phe-15</u>	297	<u>cys-46⁺ phe-15⁺</u>	0,01	0,78	
GY81	AK532	<u>str-3/cys-46⁺</u>	<u>gly-1 phe-15⁺</u>	3			
			<u>gly-1 pyr-29⁺ phe-15</u>	3	<u>cys-46⁺ pyr-29⁺</u>	0,39	0,27
			<u>gly-1 pyr-29 phe-15</u>	1	<u>cys-46⁺ phe-15</u>	0,07	0,59
			<u>gly-1 pyr-29⁺ phe-15⁺</u>	16			
		<u>gly-1 pyr-29 phe-15⁺</u>	29				

4.táblázat, folytatás.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága, <u>c</u>	térkép- távol- sága, <u>d</u>
GY81	AK532	<u>str-3</u> / <u>pyr-29</u> ⁺	<u>cys-46</u> ⁺ <u>gly-1</u> <u>phe-15</u> ⁺	8	<u>pyr-29</u> ⁺ <u>cys-46</u> ⁺	0,20	0,42
			<u>cys-46</u> ⁺ <u>gly-1</u> <u>phe-15</u>	2	<u>pyr-29</u> ⁺ <u>phe-15</u>	0,36	0,29
			<u>cys-46</u> <u>gly-1</u> <u>phe-15</u>	16			
			<u>cys-46</u> <u>gly-1</u> <u>phe-15</u> ⁺	24			

Markerek sorrendje: leu-4 phe-15 pyr-29 cys-46



A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

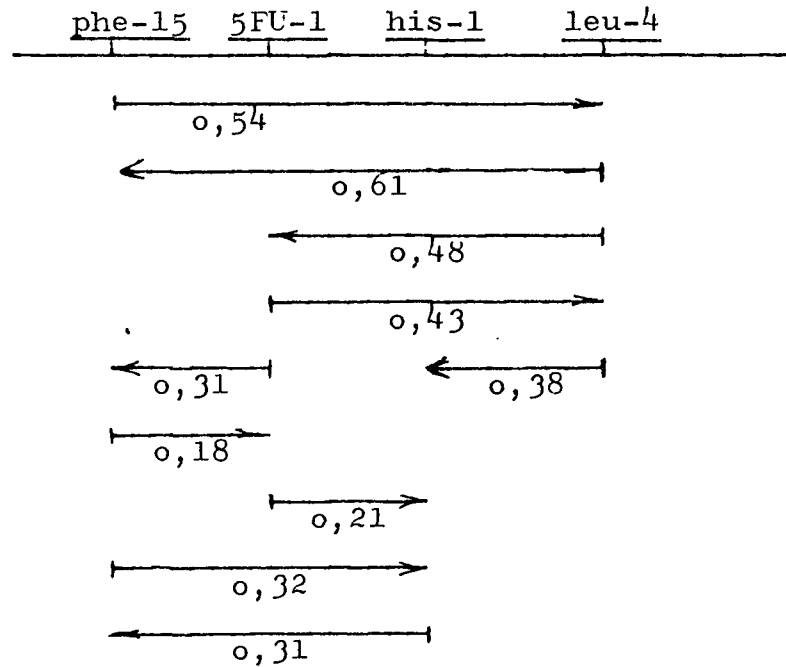
5. táblázat. A phe-15 és 5FU-1 markerek térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/
EV112	AK550	<u>str-3/leu-4⁺</u>	<u>gly-1 phe-15⁺ his-1 5FU-1</u>	1			
			<u>gly-1 phe-15⁺ his-1⁺ 5FU-1</u>	4			
			<u>gly-1 phe-15 his-1 5FU-1⁺</u>	5	<u>leu-4⁺ his-1</u>	0,24	0,38
			<u>gly-1 phe-15 his-1⁺ 5FU-1⁺</u>	38	<u>leu-4⁺ 5FU-1</u>	0,14	0,48
			<u>gly-1 phe-15 his-1 5FU-1</u>	4	<u>leu-4⁺ phe-15⁺</u>	0,06	0,61
			<u>gly-1 leu-4⁺ his-1 5FU-1</u>	5			
		<u>str-3/phe-15⁺</u>	<u>gly-1 leu-4 his-1 5FU-1</u>	10			
			<u>gly-1 leu-4⁺ his-1⁺ 5FU-1</u>	1	<u>phe-15⁺ his-1</u>	0,31	0,32
			<u>gly-1 leu-4 his-1⁺ 5FU-1</u>	12	<u>phe-15⁺ 5FU-1</u>	0,55	0,18
			<u>gly-1 leu-4 his-1⁺ 5FU-1⁺</u>	22	<u>phe-15⁺ leu-4⁺</u>	0,10	0,54
			<u>str-3/5FU-1</u>	<u>gly-1 leu-4⁺ phe-15⁺ his-1</u>	3		
				<u>gly-1 leu-4 phe-15⁺ his-1</u>	7		
		<u>gly-1 leu-4 phe-15⁺ his-1⁺</u>		6			
		<u>gly-1 leu-4⁺ phe-15 his-1</u>		6			
		<u>gly-1 leu-4⁺ phe-15⁺ his-1⁺</u>		1	<u>5FU-1 his-1</u>	0,50	0,21
		<u>gly-1 leu-4 phe-15 his-1</u>		8	<u>5FU-1 leu-4⁺</u>	0,19	0,43
		<u>gly-1 leu-4 phe-15 his-1⁺</u>	18	<u>5FU-1 phe-15⁺</u>	0,33	0,31	

32
1

5. táblázat, folytatás

Markerek sorrendje:

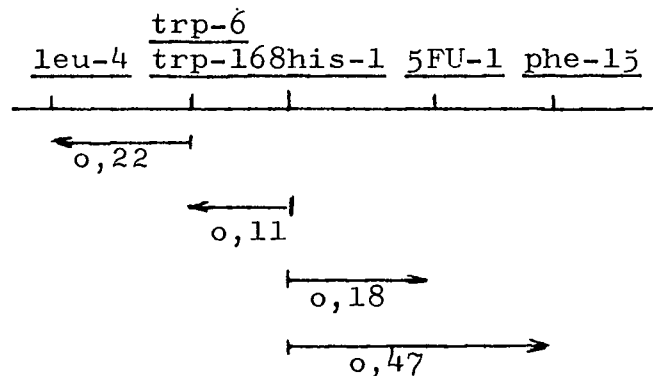


A táblázat jelmagyarozatát ld. a 3. táblázaton.

6. táblázat. A trp-6 és trp-168 markerek térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága, <u>c</u>	térkép- távol- sága, <u>d</u>
EV113	AK249	<u>str-8/leu-6</u> ⁺	nincs rekombináns		<u>trp-6</u> és <u>trp-168</u> között		
EV113	EV167	<u>trp-168/his-1</u> ⁺	<u>5FU-1</u>	15	<u>his-1</u> ⁺ <u>5FU-1</u> ⁺	0,55	0,18
			<u>5FU-1</u> ⁺	18			
		<u>5FU-1/his-1</u> ⁺	<u>trp-168</u>	38	<u>his-1</u> ⁺ <u>trp-168</u>	0,70	0,11
			<u>trp-168</u> ⁺	16			
EV74	AK249	<u>cys-46/trp-6</u> ⁺	<u>leu-4</u>	40	<u>trp-6</u> ⁺ <u>leu-4</u>	0,48	0,22
			<u>leu-4</u> ⁺	54			
EV91	EV69	<u>cys-46 gly-1/trp-168</u> ⁺	<u>leu-4</u>	104	<u>trp-168</u> ⁺ <u>leu-4</u>	0,45	0,23
			<u>leu-4</u> ⁺	125			
EV79	EV69	<u>cys-46 gly-1/trp-168</u> ⁺	<u>phe-15</u>	18	<u>trp-168</u> ⁺ <u>phe-15</u>	0,15	0,47
			<u>phe-15</u> ⁺	102			

Markerek sorrendje:



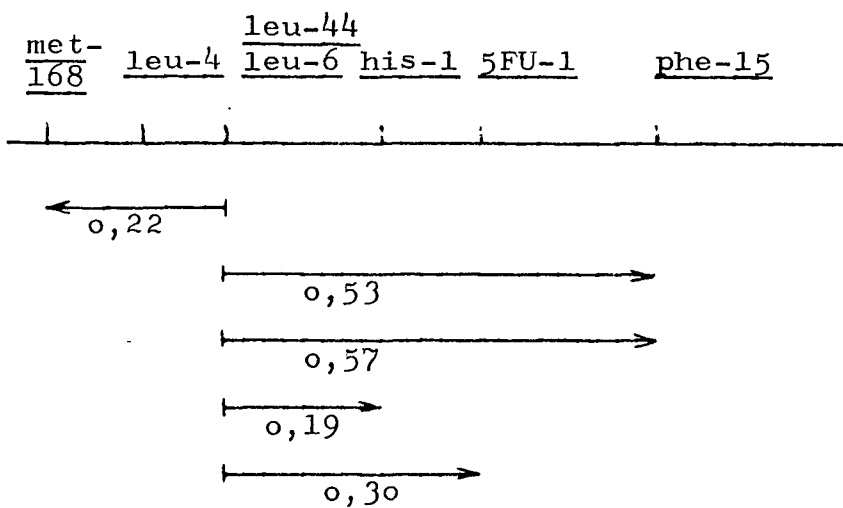
A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3. táblázatban.

7.táblázat. A leu-6 és leu-44 markerek térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	Térkép- távol- sága /d/	
EV20	GY144	<u>leu-4</u> <u>leu-6</u> között a rekombináció erősen csökkent						
EV91	JH14	<u>leu-4</u> <u>leu-44</u> között a rekombináció 1/3-ra csökkent						
		<u>leu-4/gly-1</u>	<u>gly-1</u>	0				
			<u>gly-1</u> ⁺	193	nincs kapcsoltság <u>leu-44</u> és <u>gly-1</u> között, vagy azt <u>leu-4</u> feloldja			
EV112	EV261	<u>str-10/leu-44</u> ⁺	<u>his-1</u> <u>5FU-1</u>	14				
			<u>his-1</u> <u>5FU-1</u> ⁺	12	<u>leu-44</u> ⁺ <u>his-1</u>	0,53	0,19	1
			<u>his-1</u> ⁺ <u>5FU-1</u> ⁺	21	<u>leu-44</u> ⁺ <u>5FU-1</u>	0,34	0,30	3
EV79	EV120	<u>cys-46</u> <u>gly-1/leu-44</u> ⁺	<u>phe-15</u>	4				1
			<u>phe-15</u> ⁺	46	<u>leu-44</u> ⁺ <u>phe-15</u>	0,08	0,57	
GY81	AK177	<u>str-3/cys-46</u> ⁺	<u>leu-6</u> <u>phe-15</u>	10				
			<u>leu-6</u> <u>phe-15</u> ⁺	82	<u>cys-46</u> ⁺ <u>phe-15</u>	0,11	0,52	
		<u>str-3/leu-6</u> ⁺	<u>cys-46</u> <u>phe-15</u>	5				
			<u>cys-46</u> <u>phe-15</u> ⁺	45	<u>leu-6</u> ⁺ <u>phe-15</u>	0,10	0,53	
GY75	EV55	<u>str-3/leu-6</u> ⁺	<u>met-168</u>	171				
			<u>met-168</u> ⁺	197	<u>leu-6</u> ⁺ <u>met-168</u>	0,47	0,22	

7.táblázat, folytatás.

Markerek sorrendje:



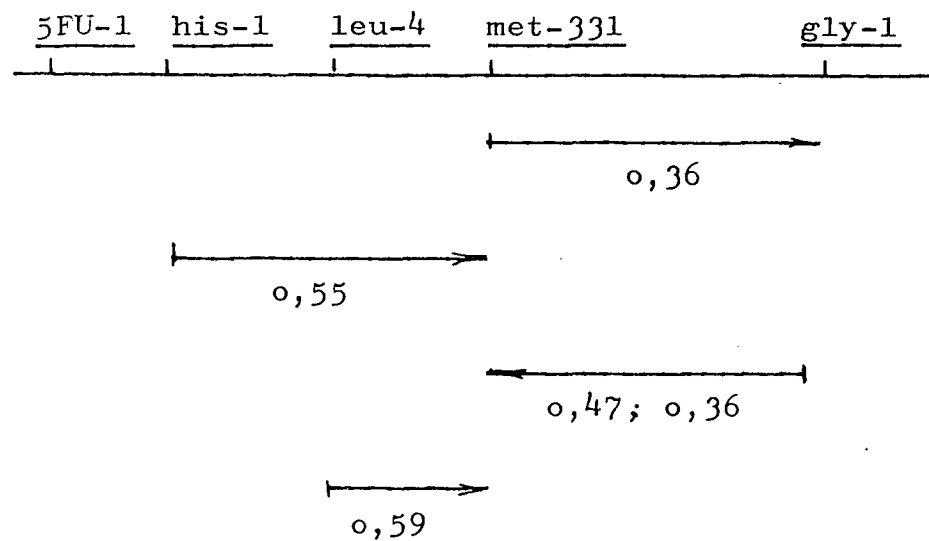
A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

8.táblázat. A met-331 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/
GY75	AK514	<u>met-331</u> és <u>met-168</u> között van rekombináns, de csökkent /kb.felére/ <u>gly-1 met-331</u> kapcsoltság nem oldja föl					
TF 7	AK184	<u>pur-1/leu-4</u> ⁺	<u>cys-46 gly-1 met-331</u>	7			
			<u>cys-46 gly-1</u> ⁺ <u>met-331</u> ⁺	1			
			<u>cys-46</u> ⁺ <u>gly-1 met-331</u> ⁺	1			
			<u>cys-46 gly-1 met-331</u> ⁺	97	<u>leu-4</u> ⁺ <u>met-331</u>	0,07	0,59
		<u>pur-1/gly-1</u> ⁺	<u>cys-46 leu-4 met-331</u>	12			
			<u>cys-46 leu-4</u> ⁺ <u>met-331</u>	3	<u>gly-1</u> ⁺ <u>met-331</u>	0,15	0,47
			<u>cys-46 leu-4 met-331</u>	83	<u>gly-1</u> ⁺ <u>leu-4</u> ⁺	0,03	0,69
GY83	AK514	<u>pur-15 str-3/met-331</u> ⁺	<u>cys-46 gly-1</u>	81			
			<u>cys-46 gly-1</u> ⁺	28	<u>met-331</u> ⁺ <u>gly-1</u> ⁺	0,26	0,36
		<u>pur-15 str-3/gly-1</u> ⁺	<u>cys-46 met-331</u>	88			
			<u>cys-46 met-331</u> ⁺	32	<u>gly-1</u> ⁺ <u>met-331</u> ⁺	0,26	0,36
TF7	EV107	<u>pur-1/his-1</u> ⁺	<u>met-331 5FU-1</u> ⁺	9			
			<u>met-331 5FU-1</u>	2			
			<u>met-331</u> ⁺ <u>5FU-1</u> ⁺	64	<u>his-1</u> ⁺ <u>met-331</u>	0,09	0,55
			<u>met-331</u> ⁺ <u>5FU-1</u>	53	<u>his-1</u> ⁺ <u>5FU-1</u> ⁺	0,57	0,17

8.táblázat, folytatás.

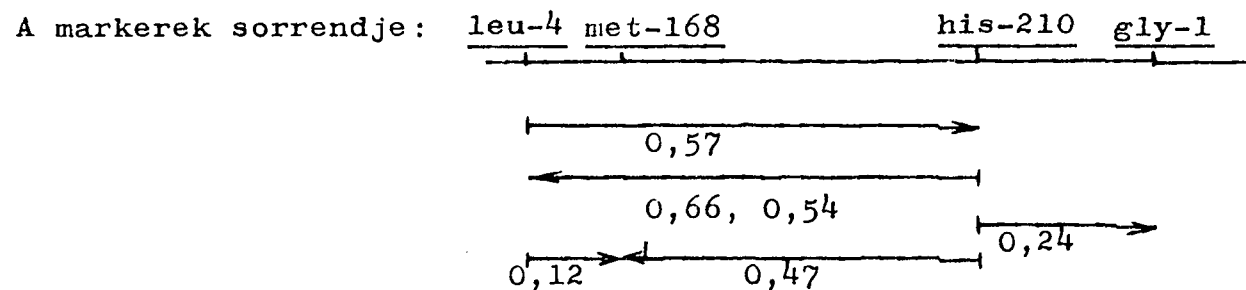
Markerek sorrendje:



A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

9. táblázat. A his-210 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/
EV91	EV64	<u>cys-46 gly-1/his-210⁺</u>	<u>pyr-2 leu-4</u>	1			
			<u>pyr-2 leu-4⁺</u>	23	<u>his-210⁺ leu-4</u>	0,04	0,66
			<u>cys-46 leu-4/his-210⁺</u>	23	<u>pyr-2 gly-1</u>		
			<u>pyr-2 gly-1⁺</u>	29	<u>his-210⁺ gly-1</u>	0,44	0,24
GY75	AK551	<u>str-3/leu-4⁺</u>	<u>his-210⁺ met-168</u>	5			
			<u>his-210 met-168</u>	36	<u>leu-4⁺ his-210⁺</u>	0,08	0,57
			<u>his-210 met-168⁺</u>	35	<u>leu-4⁺ met-168</u>	0,67	0,12
			<u>str-3/his-210⁺</u>	4			
			<u>leu-4⁺ met-168</u>	4			
			<u>leu-4 met-168</u>	3	<u>his-210⁺ met-168</u>	0,14	0,47
			<u>leu-4 met-168⁺</u>	42	<u>his-210⁺ leu-4⁺</u>	0,09	0,54



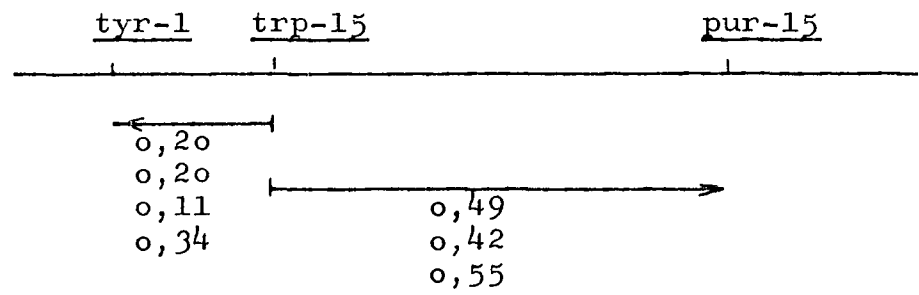
A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3. táblázatban.

10. táblázat. A trp-15 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/			
GY141	GY44	<u>cys-46/trp-15</u> ⁺	<u>tyr-1</u>	21	<u>trp-15</u> ⁺ <u>tyr-1</u>	0,29	0,34			
			<u>tyr-1</u> ⁺	6						
			<u>tyr-1</u>	113	<u>trp-15</u> ⁺ <u>tyr-1</u>	0,53	0,20			
			<u>tyr-1</u> ⁺	105						
			<u>tyr-1</u>	32						
			GY83	EV62	<u>str-4/trp-15</u> ⁺	<u>tyr-1</u> ⁺	28	<u>trp-15</u> ⁺ <u>tyr-1</u>	0,53	0,20
						<u>tyr-1</u>	15			
<u>tyr-1</u> ⁺	6	<u>trp-15</u> ⁺ <u>tyr-1</u>				0,71	0,11			
<u>pur-15</u>	39									
<u>pur-15</u> ⁺	259							<u>trp-15</u> ⁺ <u>pur-15</u>	0,13	0,49
<u>pur-15</u>	8									
GY141	GY45	<u>cys-46/pur-15</u> ⁺	<u>pur-15</u> ⁺	33	<u>trp-15</u> ⁺ <u>pur-15</u>	0,20	0,42			
			<u>pur-15</u>	3						
			<u>pur-15</u> ⁺	31	<u>trp-15</u> ⁺ <u>pur-15</u>	0,09	0,55			
			<u>pur-15</u>	3						
			<u>tyr-1</u>	3						
			<u>tyr-1</u> ⁺	115	<u>pur-15</u> ⁺ <u>tyr-1</u>	0,03	0,69			

10.táblázat, folytatás.

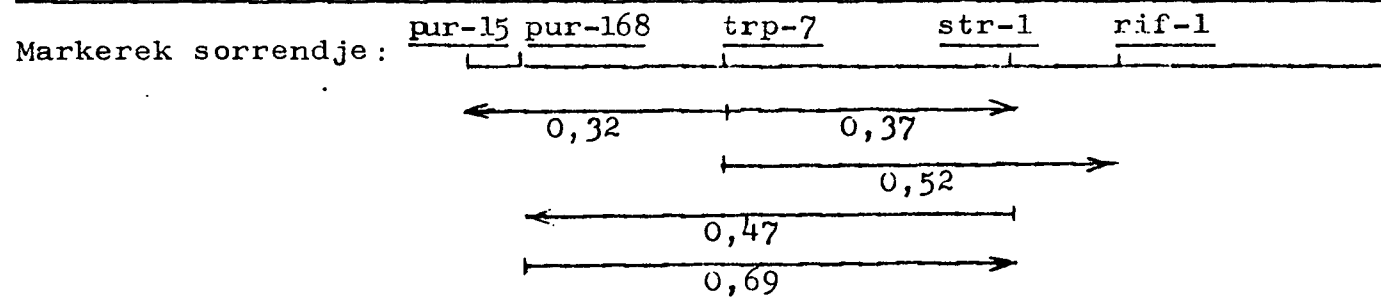
Markerek sorrendje:



A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

11.táblázat. A trp-7 és pur-168 markerek térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelktált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/
GY83	AK250	<u>str-8/trp-7⁺</u>	<u>pur-15</u>	128			
			<u>pur-15⁺</u>	278	<u>trp-7⁺ pur-15</u>	0,32	0,32
		<u>pur-15/trp-7⁺</u>	<u>str-8</u>	15			
			<u>str-8⁺</u>	46	<u>trp-7⁺ str-8⁺</u>	0,25	0,37
EV31	AK250	<u>his-1/trp-7⁺</u>	<u>rif-1</u>	15			
			<u>rif-1⁺</u>	122	<u>trp-7⁺ rif-1</u>	0,11	0,52
EV91	GY41	<u>cys-46 gly-1 leu-4/ /pur-168</u>	<u>str-3</u>	9			
			<u>str-3⁺</u>	271	<u>pur-168⁺ str-3</u>	0,03	0,69
		<u>cys-46 gly-1 leu-4/ /str-1</u>	<u>pur-168</u>	100			
			<u>pur-168⁺</u>	18	<u>str-1 pur-168⁺</u>	0,15	0,47



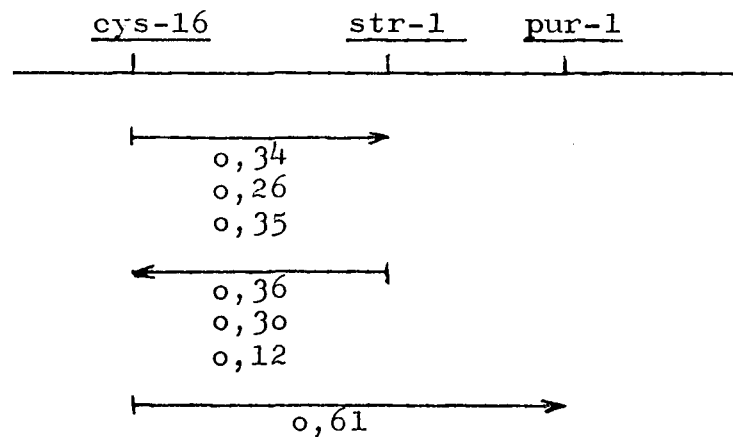
A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

12. táblázat. A cys-16 marker térképezése.

Donor	Reci- piens	Ellenszelektált/ szelektált marker	A rekombinánsok nem szelektált osztályai	Telep- szám	Markerpárok	kap- csolt- sága /c/	térkép- távol- sága /d/	
AK209	AK239	<u>pur-1 pyr-29/cys-16⁺</u>	<u>str-2</u>	4	<u>cys-16⁺ str-2</u>	0,08	0,57	
			<u>str-2⁺</u>	47				
		<u>pur-1 pyr-29/str-2</u>	<u>cys-16</u>	26				
			<u>cys-16⁺</u>	9	<u>str-2 cys-16⁺</u>	0,26	0,36	
		<u>pyr-29/cys-16⁺</u>	<u>pur-1⁺ str-2</u>	14				
			<u>pur-1 str-2</u>	4	<u>cys-16⁺ str-2</u>	0,29	0,34	1
AK208	AK239	<u>his-1/cys-16⁺</u>	<u>pur-1⁺ str-2⁺</u>	45	<u>cys-16⁺ pur-1</u>	0,06	0,61	43
			<u>str-1</u>	20				
		<u>str-1⁺</u>	30	<u>cys-16⁺ str-1</u>	0,40	0,26	1	
		<u>his-1/str-1</u>	<u>cys-16</u>	34				
			<u>cys-16⁺</u>	17	<u>str-1 cys-16⁺</u>	0,34	0,30	
EV218	AK239	<u>his-1/cys-16⁺</u>	<u>str-7</u>	14				
			<u>str-7⁺</u>	36	<u>cys-16⁺ str-7</u>	0,28	0,35	
		<u>his-1/str-7</u>	<u>cys-16</u>	16				
			<u>cys-16⁺</u>	34	<u>str-7 cys-16⁺</u>	0,68	0,12	
EV96	AK239	nincs rekombináns	<u>cys-16</u> és <u>trp-7</u> között, de a <u>str-4</u> átvitelét nem befolyásolja.					

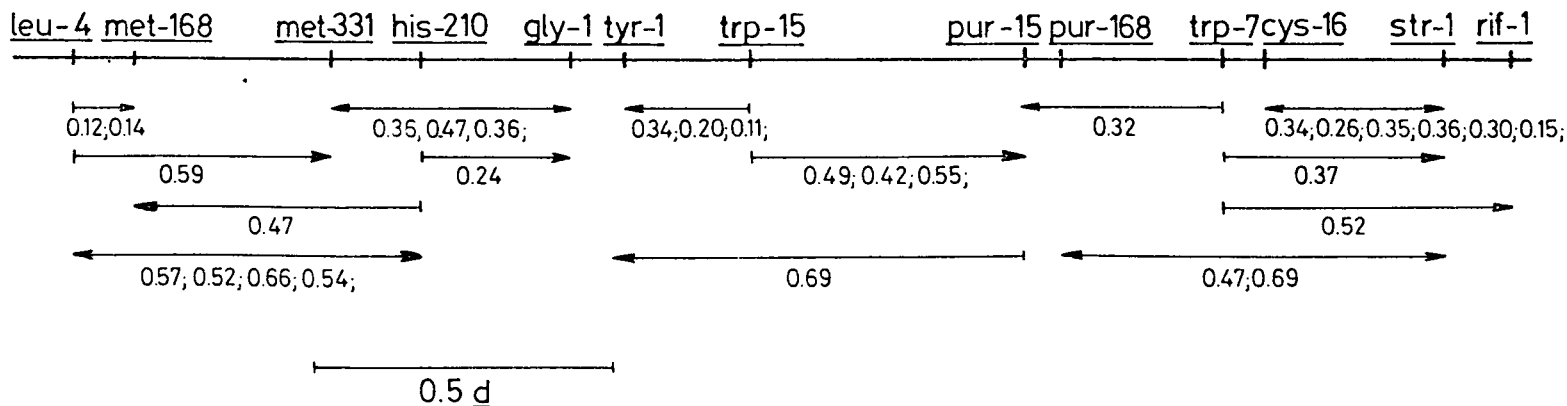
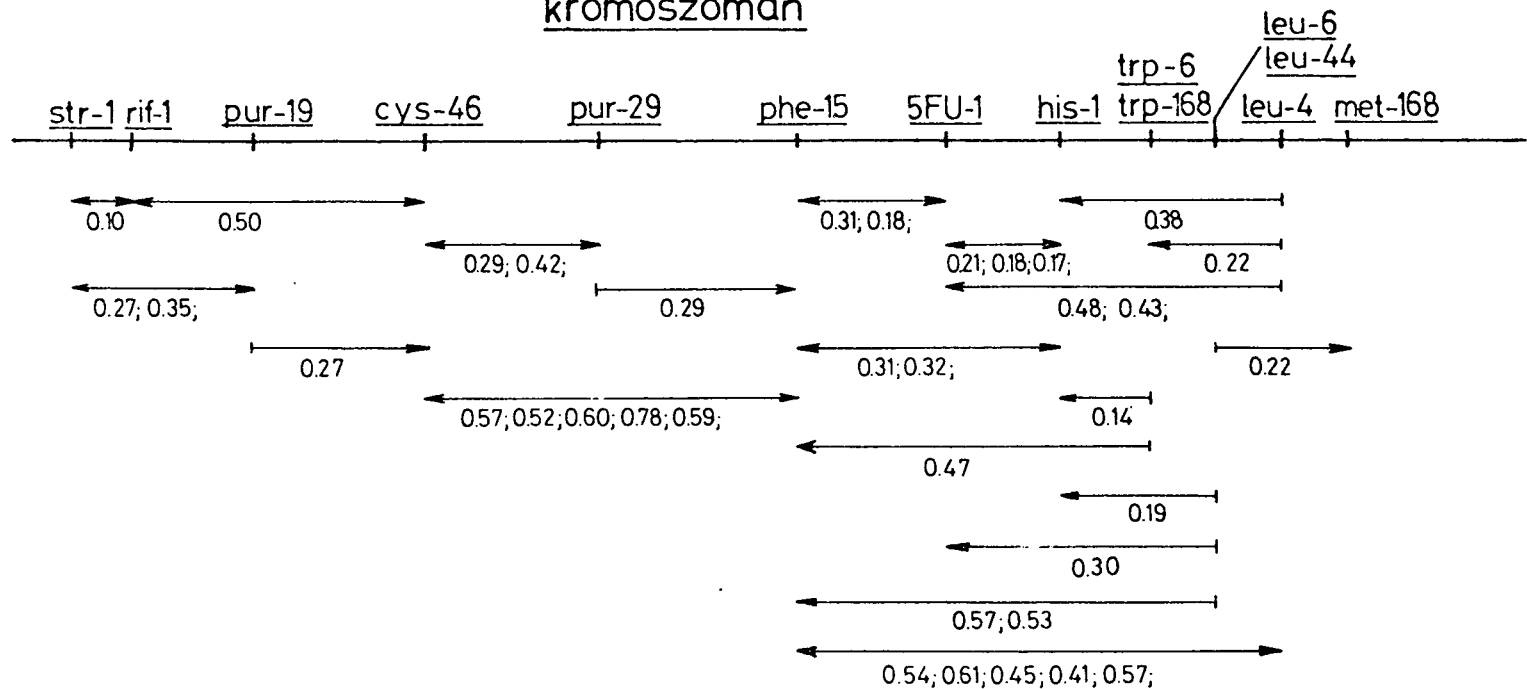
12.táblázat, folytatás.

Markerek sorrendje:



A táblázat jelmagyarázatát ld. a 3.táblázatban.

A 15 pont sorrendje és egymáshoz mért távolsága a R.meliloti 41 kromoszómán



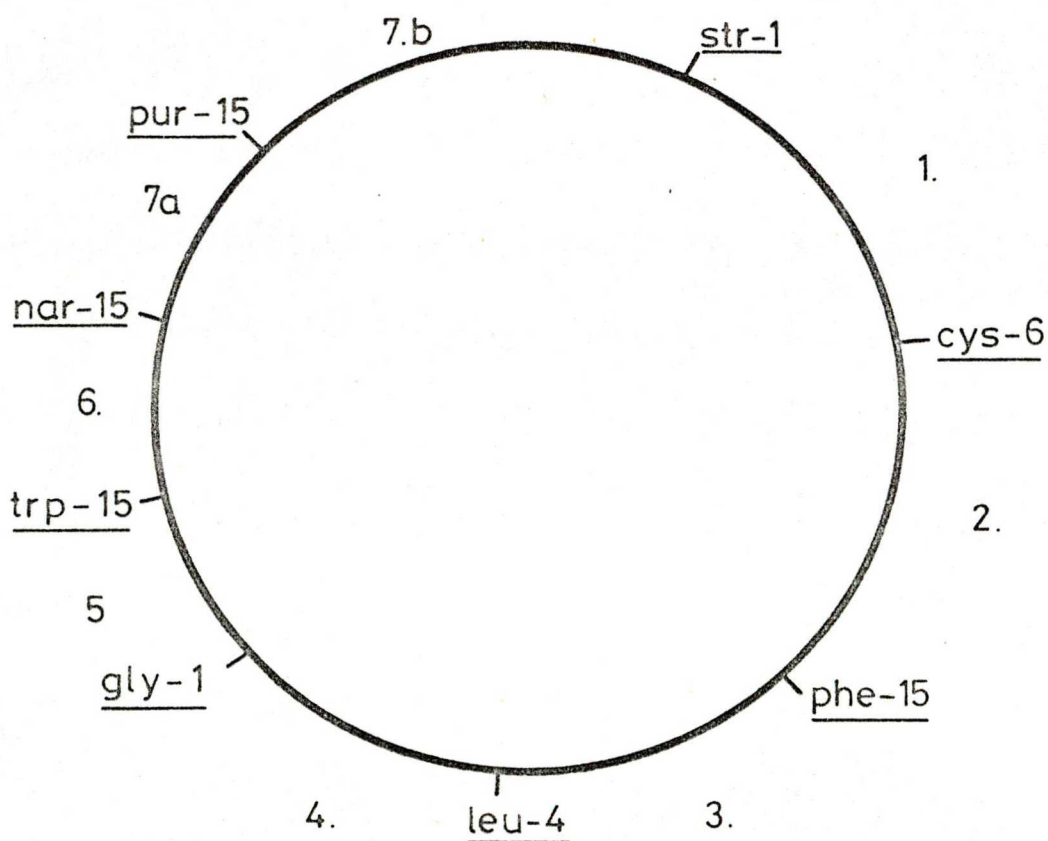
Az egyes pontok lokalizálásakor elvégzett keresztezéseket a 4.-13. táblázatok tartalmazzák.

4.2. Gyorstérképezési rendszer előállítása.

Az ismeretlen térképhelyű mutánsok gyors lokalizálásához szükség volt egy, a teljes kromoszómát átfogó recipiens párok-
ból álló sorozat megteremtésére. Ehhez kapcsoltsági térképünk a-
lapján olyan mutánsokat választottunk ki, amelyek páronként
egymással kapcsoltságot mutattak /min. 4%-ot/ és megfelelő ke-
resztezésekkel előállítottuk a kívánt recipiens párokat. A 3.
ábrán a kör alakú térképen feltüntettem a lehetséges párokat.
A cys-46 str-1 /1.jelű/, nar-B-15 trp-15 /6.jelű/ és a nar-B-
15 pur-15 /7.a és 7.b jelű/ törzsek rendelkezésünkre álltak, a
gly-1 leu-4 auxotrófiákat hordozó törzs /4.jelű/ a cys-46 gly-
1 leu-4 str-3 törzsből cys-46⁺ revertáns izolálásával egysze-
rűen előállítható volt. A cys-46 phe-15 /2.jelű/, phe-15 leu-4
/3.jelű/ és gly-1 trp-15 /5.jelű/ auxotrófia párokat hordozó
törzseket megfelelően megválasztott keresztezésekkel kellett
előállítani, amelyet a 4.ábrán tüntettem fel. A 4.a esetben
donorként a phe-15 auxotrófiát hordozó R68.45 tartalmú törzset
használtam és a donor ellen streptomocinnel ellenszelektáltam.
A recipiens törzs cys-46 leu-4 gly-1 str-3 genotipusú volt.
Mind a cys-46⁺ /1.vonal/, mind a leu-4⁺ /2.vonal/ rekombináci-
ós kategóriákból azokat a telepeket kerestem, amelyek megkap-
ták a donortól a phe-15 auxotrófiát. Így a cys-46⁺ szelekció-
val kaptam phe-15 leu-4 gly-1 str-3, a leu-4⁺ szelekcióval
pedig cys-46 phe-15 gly-1 str-3 kategóriákat. A plazmidot a
rekombinánsokból hőkúrálással távolítottuk el. A számunkra
szükséges törzseket mindkét esetben a már R68.45 mentes törzs-
ből gly-1⁺ revertáns izolálásával állítottuk elő. A gly-1 trp-
15 törzs előállítása a 4.b ábrán ábrázoltak szerint történt.

3. ábra

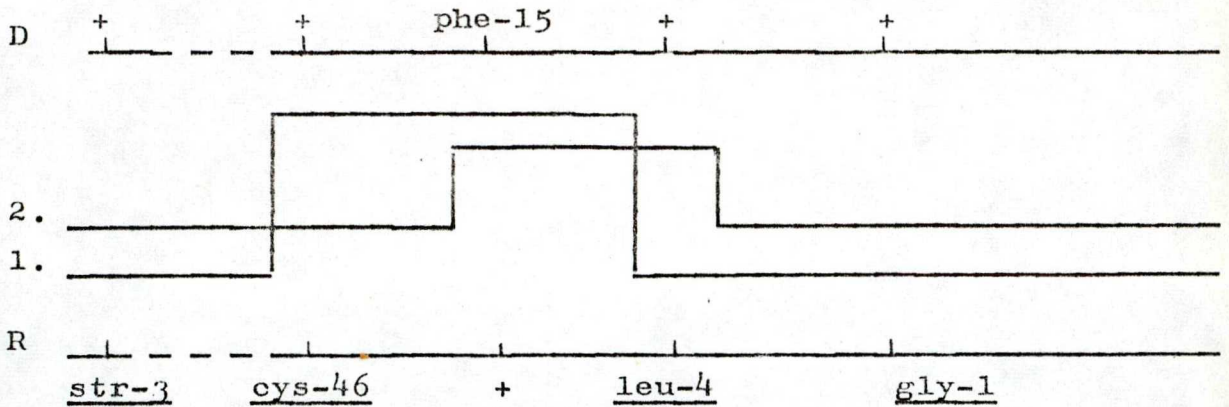
A teljes kromoszomát átfedő 7 recipiens elhelyezkedése a kör alakú térképen



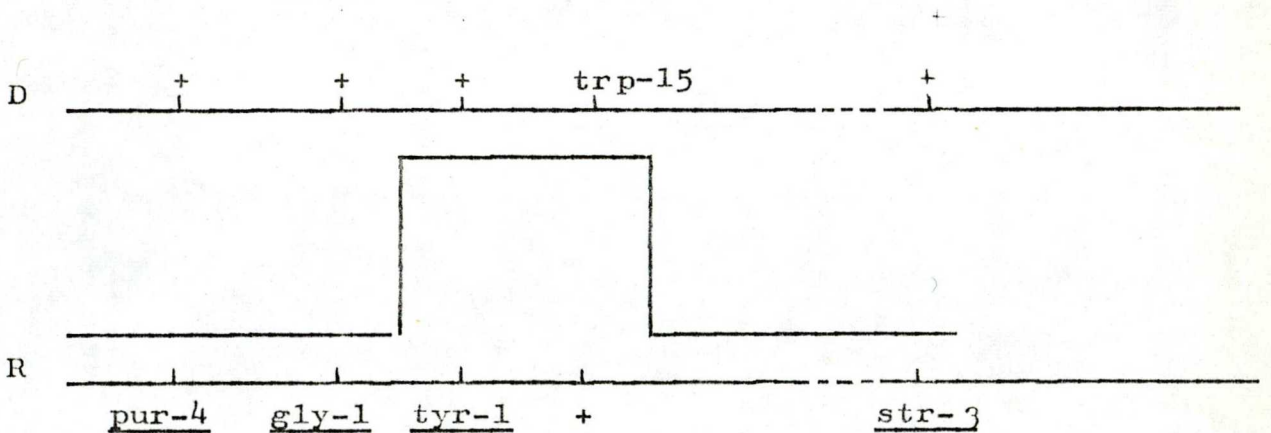
A recipiensek auxotróf ill. rezisztencia markereinek kapcsoltsága(%)

1. <u>cys-46⁺</u>	<u>str</u>	10
2. <u>cys-46⁺</u>	<u>phe-15⁺</u>	11
3. <u>phe-15⁺</u>	<u>leu-4⁺</u>	16
4. <u>leu-4⁺</u>	<u>gly-1⁺</u>	4
5. <u>gly-1⁺</u>	<u>trp-15⁺</u>	33
6. <u>trp-15⁺</u>	<u>nar B-15⁺</u>	44
7a <u>narB-15⁺</u>	<u>pur-15⁺</u>	38
7b <u>pur-15⁺</u>	<u>str</u>	10

a./ A cys-46 phe-15 és phe-15 leu-4 autotrófia markereket hordozó törzsek előállítása.



b./ A gly-1 trp-15 auxotrófiákat hordozó törzs előállítása.



Az ábrák magyarázatát lásd a szövegben.

A donor trp-15, R68.45 plazmidot tartalmazó törzs volt, a recipiens pedig gly-1 pur-4 tyr-1 str-3 genotípusú volt. A donor ellen itt is streptomocinnel ellenszelektáltam. A tyr-1⁺ rekombinánsok között a keresett kategória a pur-4 gly-1 trp-15 str-3 volt. Ezt a törzset a továbbiakban a benne levő R68.45 plazmid eliminálása nélkül használtuk, mint "recipienst". A jelenlévő plazmid ugyan egy nagyságrenddel lecsökkentette a rekombinánsok számát, de a gly-1 trp-15 33%-os kapcsoltsága biztosította, hogy a vizsgálatainkhoz elegendő számú rekombinánst nyerjünk. A gyorstérképezéshez szükséges recipiensek eleget tesznek a kiindulási feltételnek, vagyis a rajtuk lévő markerek kapcsoltak és átfedik a teljes kromoszómát /3.ábra/.

A rendelkezésünkre álló recipienssorozattal bármely ismeretlen térképhelyű mutáns 7 keresztezéssel lokalizálható a kromoszómára. Ehhez a térképezési rendszerhez a mutánsból donort kell izolálni, vagyis konjugációval bele kell vinni az R68.45 plazmidot és a transzkonjugánsok közül ki kell választani a Cma⁺-t. Az ismeretlen mutációt hordozó donorral elvégezzük a hét keresztezést, kettős prototrófokra szelektálunk, és replikatechnikával megállapíthatjuk, hogy a kérdéses mutáció melyik régióba lokalizálható. Ezután ennek a régiónak részletes analizisével megállapíthatjuk a pontos térképhelyet.

A recipiens rendszer használhatóságának bizonyítéka, ha már ismert térképhelyű mutánsokat tudunk lokalizálni az előzetesen megállapított régióba /13.táblázat/. A cys-46 str régióba térképezett pur-1 auxotrófia, a phe-15 leu-4 régióba térképezett his-1 auxotrófia ebben a rendszerben is ezekbe a régiókba lo-

13. táblázat. A recipiens párok szelektálható markerck térképezésére való használhatóságának bizonyítása.

Szelektált allélpárok	A donor mutáns alléljének a szelektált markerpárral való együttes átjutási gyakorisága /%/			
	<u>pur-1</u>	<u>pur-24</u>	<u>his-1</u>	<u>5FU-1</u>
<u>str cys-46⁺</u>	98	100	8	0
<u>cys-46⁺ phe-15⁺</u>	8	16	2	84
<u>phe-15⁺ leu-4⁺</u>	0	0	92	100
<u>leu-4⁺ gly-1⁺</u>	0	* -	6	16
<u>gly-1⁺ trp-15⁺</u>	0	4	2	10
<u>trp-15⁺ narB-15⁺</u>	0	0	0	0
<u>narB-15⁺ pur-15⁺</u>	0	0	0	0
<u>pur-15⁺ str</u>	0	0	0	0

* nem tesztelt

A táblázat magyarázatát ld. a szövegben.

kalizálható. Az 5FU-1 rezisztencia a phe-15 leu-4 régióban helyezkedik el, de a cys-46 phe-15 régióba kapott magas érték azt is jelzi, hogy az 5FU-1 marker a phe-15-höz közeli helyzetű.

4.3. R.meliloti törzsek összehasonlítása gyorstérképezési rendszer felhasználásával.

A recipiens párok alkalmasak voltak a laboratóriumunkban használt Rm41 törzs, illetve néhány külföldi laboratóriumban használt Rm2011 törzsek összehasonlítására. Donort izoláltam a Rm2011 törzsből és elvégeztem a hét keresztezést. A R.meliloti 2011 törzsszel kapott kapcsoltsági értékek azonosak voltak a R.meliloti 41 donorral kapott adatokkal /14.táblázat/, vagyis a két Rhizobium törzs az R68.45-ös konjugációs térképezési rendszer feloldási szintjén nagyon hasonló.

4.4. R.meliloti 41 kromoszómális DNS darabot hordozó in vitro RP4-prime-ok kromoszóma mobilizációs képességének vizsgálata R.meliloti 41-ben.

A nagyon közeli pontok térképsorrendjének eldöntésére az R-prime-ok homológ régióban megnövekedett polarizált transzferképességét akartuk felhasználni. Ezeknek a kísérleteknek az elvégzéséhez először R-prime-okat kellett előállítanunk.

A R-prime-okat a R.meliloti 41 össz-DNS RP4 jelű plazmidon való klónozásával állítottuk elő. Az RP4 plazmid azért mutatkozott alkalmasnak ezekhez a kísérletekhez, mert a rajta lévő restrikciós helyeket /1-1 hasítási helye van rajta az EcoRI, BamHI és HindIII restrikciós endonukleázoknak, és az utóbbi enzim a plazmid hordozta Km^R génben hasít/ könnyen felhasználhattuk, és mert konjugatív plazmid lévén, Rhizobiumba is



14. táblázat. R.meliloti 41 auxotrófia és rezisztencia
markerek kapcsoltsága Rm41 és Rm2011 törzsből származó
donorral.

Markerpárok	Kapcsoltsági érték /%/	
	Rm41 donorral	Rm2011 donorral
<u>str cys-46</u> ⁺	10	10
<u>cys-46</u> ⁺ <u>phe-15</u> ⁺	11	7
<u>phe-15</u> ⁺ <u>leu-4</u> ⁺	16	12
<u>leu-4</u> ⁺ <u>gly-1</u> ⁺	4	4
<u>gly-1</u> ⁺ <u>trp-15</u> ⁺	33	31
<u>trp-15</u> ⁺ <u>narB-15</u> ⁺	44	44
<u>narB-15</u> ⁺ <u>pur-15</u> ⁺	38	40
<u>pur-15</u> ⁺ <u>str</u>	10	7

A donorok his-1 str⁺ 5FU-1 genotípusúak. Ellenszelekcióra a his-1 markert használtam, phe-15 leu-4 régióban pedig a rif rezisztenciát.

könnyen bejuttatható. Harmadik, számunkra nagyon előnyös tulajdonsága, hogy R.meliloti 41 törzsben nem, vagy alig képes kromoszóma mobilizációra. A 15. táblázatból látható, hogy az egyes pontokra kapott rekombinációs frekvencia és a markerek reverziós gyakorisága nagyon közeli értékek. A klónozás sémáját az 5. ábra tartalmazza. A klónozást dr.Koncz Csaba végezte; a munkába én a transzformánsok jellemzésénél kapcsolódtam be. A transzformánsokat ampicillin tartalmú lemezen szelektáltuk, és így 810 klónt kaptunk. Ezeket megvizsgáltam az RP4 hordozta másik két rezisztenciamarkerre, tetraciklinre és kanamicinre /16.táblázat/. A számunkra fontosak a kanamicin szenzitív /Km^S/ és tetraciklin rezisztens /Tc^R/ klónok voltak, mert ezekről tételezhető fel, hogy Km^S-uk beépült idegen DNS darab eredménye. A Km^STc^R klónokat konjugációs képesség szempontjából vizsgáltam. A vizsgált 392 Km^STc^R klón közül csak 31 őrizte meg az eredeti RP4 plazmidra jellemző konjugatív képességét. Ha az RP4 plazmidot idegen DNS nélkül, önmagával kapcsoljuk össze, a transzformánsok között kapunk hasonló kategóriákat, csak kisebb gyakorisággal /16.táblázat/. A további vizsgálatokban ezek a Km^STc^R klónok nem különböztethetők meg egyszerű teszteléssel az idegen DNS-darabot hordozó hasonló klónoktól, de ezek a kísérleteket nem zavarják.

A 31 transzferábilis, feltételezhetően idegen DNS darabot hordozó klón R.meliloti 41-ben mutatott komplementációs és kromoszóma mobilizációs képességét megvizsgáltam. A megvizsgált 22 auxotrófia- ill. rezisztenciamarkerrel komplementációt nem kaptam. A klónok kromoszóma mobilizációs képességének vizsgálatához a feltételezhetően rekombináns RP4 plazmidokat

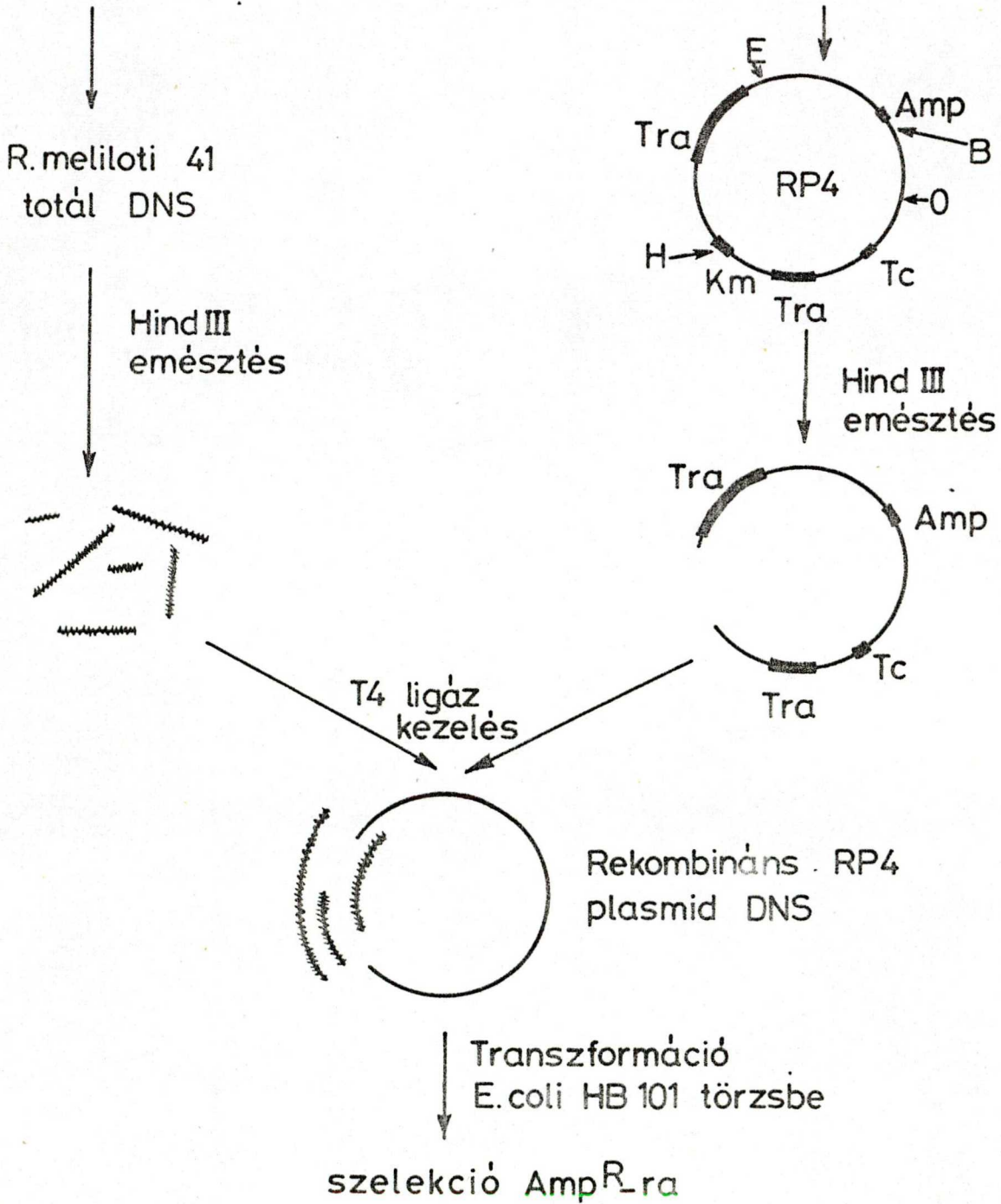
15.táblázat. A reverziós gyakoriság és az RP4 plazmid kromoszóma mobilizációs értékeinek összehasonlítása.

Marker	Reverziós gyakoriság $\times 10^{-8}$ /recipiens sejt	RP4 plazmiddal kapott rekombinációs gyakoriság $\times 10^{-8}$ /recipiens sejt
<u>pur-15</u>	26	94
<u>trp-7</u>	79	520
<u>cys-10</u>	2,6	6,0
<u>pyr-24</u>	2,0	21
<u>pur-19</u>	56	81
<u>pur-3</u>	54	120
<u>pur-1</u>	40	66
<u>cys-46</u>	41	120
<u>pyr-2</u>	1,1	22
<u>pyr-29</u>	52	110
<u>phe-15</u>	14	90
<u>trp-6</u>	47	-*
<u>leu-4</u>	7,1	51
<u>met-168</u>	15	77
<u>met-2</u>	12	-
<u>his-210</u>	5,2	55
<u>gly-1</u>	11	76
<u>trp-15</u>	13	19

* -: nem tesztelt

R.m 41 DNS-t hordozó rekombináns plazmid előállítása in vitro

DNA preparálás



16.táblázat. Az RP4 klónok fenotípusa E.coli törzsbe való transzformáció után.

Izolált klónok száma	Szelektált marker	A nem szelektált plazmid markerek osztályai	Transzferképesség
Idegen DNS-sel összekapcsolt RP4 klónok			
		392 Km ^S Tc ^R	361 Tra ⁻ 31 Tra ⁺
810	Ap ^R	302 Km ^R Tc ^R 57 Km ^S Rc ^S 59 Km ^R Tc ^S	
Idegen DNS nélkül összekapcsolt RP4 klónok			
		5 Km ^S Tc ^R	1 Tra ⁻ 4 Tra ⁺
31	Ap ^R	2 Km ^S Tc ^S 24 Km ^R Tc ^R	

átvittem R.mcliloti 41 his-1 auxotróf törzsbe. A kromoszóma mobilizációs kísérletekben ellenszelekcióra a hisztidin auxotrófiát vagy streptomocint használtam. A 31 klón közül négy mutatott kromoszóma mobilizációs képességet /17.táblázat/. Ez a négy klón a megfelelő markereket 2-3 nagyságrenddel jobban mobilizálja, mint az RP4 önmagában. A pEV87 klón a phe-15 a pEV216 a pyr-29, a pEV420 a trp-7 régiót juttatja át egyik sejtől a másikba, nagy gyakorisággal. A pEV210 klónról a háttérhez közelálló értékek ellenére megállapítható, hogy a leu-4 régiót mobilizálja. A mobilizáció hiányát a hisztidin jelenlétében, illetve hiányában kimutatható transzfer gyakoriság változása valószínűsíti /18.táblázat/.

A 6.ábrán feltüntettem, hogy a négy, kromoszóma mobilizációra képes RP4-prime mely régióban, milyen irányítottsággal képes polarizált transzferre.

17.táblázat. Kromoszóma mobilizáció RP4 prime-okkal.

Vizsgált markerek	Rekombinációs gyakoriság x 10 ⁻⁸ /recipiens sejt			
	pEV87	pEV210	pEV216	pEV420
<u>cys-10</u>	7,0	- [*]	55	-
<u>pyr-24</u>	4,6	-	610	-
<u>pur-19</u>	46	-	420	-
<u>pur-3</u>	58	-	3800	-
<u>pur-1</u>	75	42	4300	-
<u>cys-46</u>	4,8	32	1300	-
<u>pyr-2</u>	57	-	7600	-
<u>pyr-29</u>	75	100	51000	-
<u>phe-15</u>	25000	130	61	-
<u>trp-6</u>	1100	160	33	-
<u>leu-44</u>	-	180	-	-
<u>leu-6</u>	-	160	-	-
<u>leu-4</u>	1000	320	83	-
<u>met-168</u>	1300	41	12	-
<u>met-331</u>	-	1,4	12	0,87
<u>his-210</u>	2000	23	250	-
<u>pur-4</u>	-	-	-	2,2
<u>gly-1</u>	63	35	140	35
<u>trp-15</u>	19	35	6,9	370
<u>pur-15</u>	22	-	25	5000
<u>pur-168</u>	-	-	-	6400
<u>trp-7</u>	76	-	-	27000
<u>cys-10</u>	7,0	-	-	81

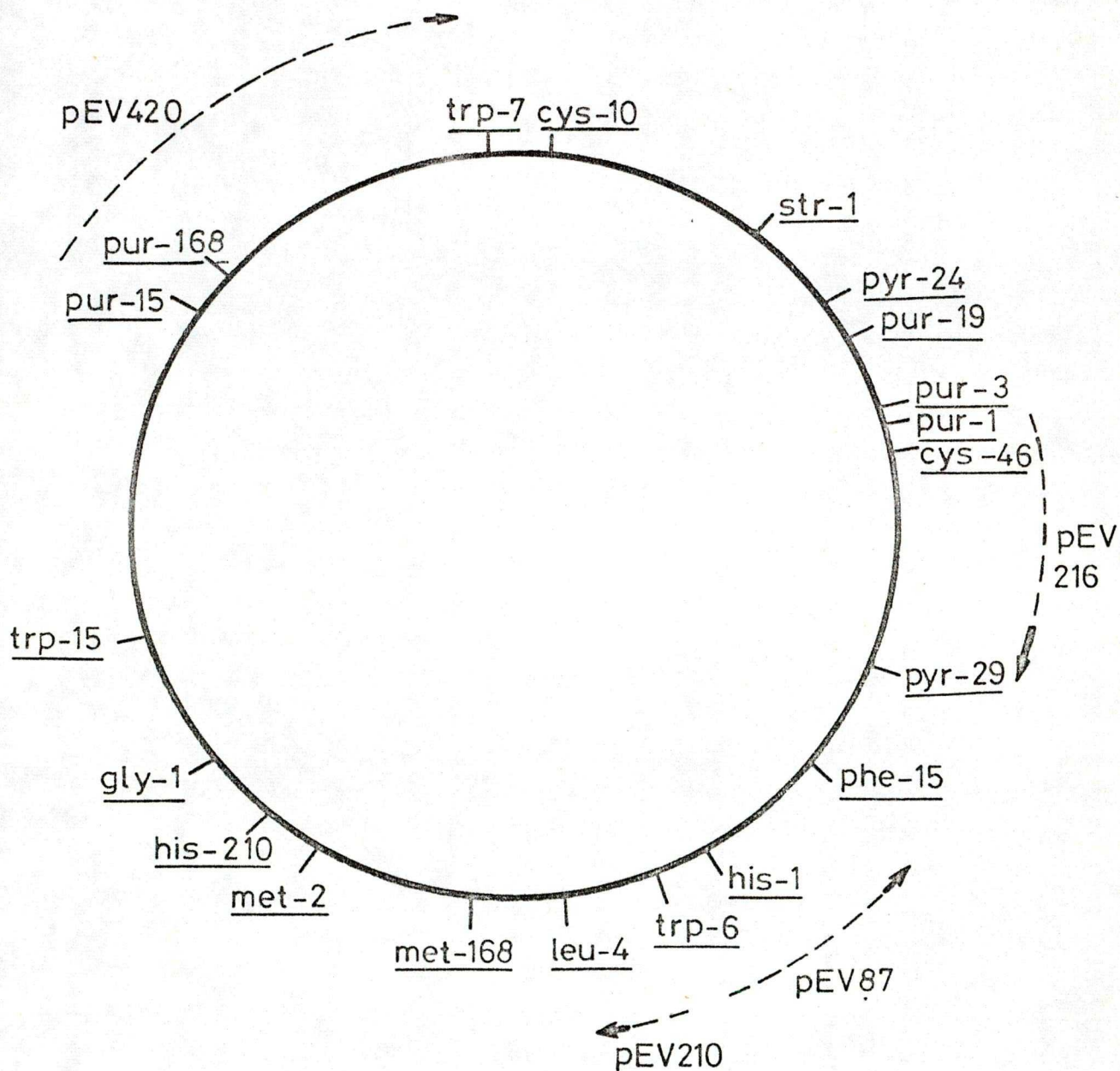
* nem tesztelt

18. táblázat. Kromoszóma mobilizáció pEV210 jelű plazmiddal.

Szelektált marker	A táptalaj kiegészítése	Transzfergyakoriság rekombinánsok/recipiensek
<u>leu-4⁺</u>	-	$1,2 \times 10^{-6}$
	his	$3,2 \times 10^{-6}$
<u>phe-15⁺</u>	-	$1,1 \times 10^{-7}$
	his	$1,3 \times 10^{-6}$
<u>pyr-29⁺</u>	-	$5,0 \times 10^{-7}$
	his	$1,0 \times 10^{-6}$

6. ábra

Az in vitro előállított RP4'-ok által mobilizált regio és a transzfer iránya R.meliloti 41-ben



Az inszertált DNS méretét jelképezi a vastag nyíl, jöllehet fizikai módszerrel nem határoztam meg a beépült fragment méretét, a szaggatott vonal pedig a kromoszóma motilizáció irányát jelzi.



5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. R68.45 konjugációs rendszerrel való térképezés R.meliloti-
ban.

5.1.1. Módosított WU képlettel számított additivitás Rm41-ben.

A R.meliloti 41 kapcsoltsági térképén lokalizált 15 új pont sorrendje - kivéve a nagyon közel vagy azonos helyre térképeződő mutációkat - egyértelműen eldönthető volt. A módosított képlet akkor alkalmazható, ha feltesszük, hogy az R68.45 plazmid megközelítően azonos méretű DNS darabokat juttat át egyik sejtből a másikba /KONDOROSI és mts., 1977; BÁNFALVI, 1977; KONDOROSI, 1977/. A kapott kapcsoltsági értékek kb. 10%-os hibahatáron belül additívek, kivéve, ha a régiót sok részre bontjuk fel /pl. a 3. táblázatban látható keresztezés/. A phe-15 leu-4 régió részletes analizise azt mutatja, hogy a részkapcsoltságek összege nagyobb lesz, mint az a két szélső marker kapcsoltsága alapján várható lenne. Ennek oka lehet, hogy itt az egyes keresztezések hibája összeadódik, másrészt konjugációs rendszerünk, miután nagy fragmentek jutnak át, kis távolságokra nem lehet érzékeny.

A "d" érték torzulását eredményezheti, ha az auxotrófia megnyilvánulása fiziológias hatások miatt nem egyértelmű. Az 5. táblázat 2. keresztezésében mind a leu-4⁺ met-331, mind a gly-1⁺ met-331 kapcsoltságek kisebb, mint az várható lenne. A kapcsoltságek érték torzulásának magyarázata, hogy cisztein jelenlétében a metionin auxotróf telepek kiértékelése bizonytalan, mert az auxotróf telepek is mutatnak növekedést. A met-331 gly-1-hez való kapcsoltságekát reálisabban tükrözi a 5. táblázat 3. keresztezése, ahol a kapcsoltságek megállapítása a

met-331⁺ telepek megjelenésével állapítható meg.

A kapcsoltságok és az ebből számított \bar{d} értékek torzulásának egy másik lehetséges oka az R68.45 plazmid kromoszóma mobilizációs sajátágaiból következik. Az R68.45-nek a bevezetőben említett tulajdonsága, hogy a kromoszóma minden pontjáról közel azonos frekvenciával képes kromoszóma mobilizációt indítani, csak megközelítőleg igaz. A cys-46 régióra mindig nagyobb számú rekombinántot kapunk, mint pl. a kromoszóma átellenes pontján lévő gly-1 markerre. Ez a polaritás erősen donortól függő, vagyis vannak olyan donorok, melyekkel ez a különbség 3-5-szörös a cys-46 és gly-1 viszonylatában /pl.GY83/, másoknál ez a különbség nem ilyen kifejezett /pl.AK208/. A jelenség magyarázatát nem tudjuk, de a R.meliloti 41-ben a cys-46 régió kromoszóma mobilizációs szempontból kitüntetett. Ezt támasztják alá a R.meliloti-ban végzett in vivo R-prime előállítási kísérletek is. KISS és mts. /1980/ kimutatták, hogy in vivo R68.45 prime a cys-46 régióra egyszerűen előállítható, míg a többi régióra végzett ilyen irányú kísérletek eddig nem vezettek eredményre. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy csak a cys-46 régióra izolálható R-prime az általuk leírt módszerrel, csak utal arra, hogy a többi régióban stabilan plazmidba épülő származék jóval nehezebben képződik.

A felsorolt problémák ellenére az R68.45 konjugációs térképezési rendszerrel a markerek egymáshoz viszonyított sorrendje nem túl nagy /max.80%/ kapcsolttság esetén egyértelműen megállapítható, a távolságuk megállapítására a \bar{d} érték megközelítőleg reális, de a tényleges fizikai távolság megállapítására

a perctérkép elkészítésére lenne szükség. R68.45 plazmával Pseudomonas aeruginosa törzsben lehetséges volt perctérképet készíteni /HAAS és HOLLOWAY, 1977/, de R.meliloti-ban az ilyen kísérleteink eddig nem sikerültek.

A módosított WU-képletet alkalmaztuk több, irodalomban közölt Rhizobium kapcsoltsági térkép /MEADE és SINGER, 1977; BERINGER és mtsai, 1978/ elemzésére és a R.meliloti 41 térképpel való összehasonlításra /KONDOROSI és mts., 1980/. A kapcsoltsági értékek additív térképtávolságokká transzformálhatók, és az elemzés mutatja, hogy R.meliloti törzsek és a R.le-guminosarum genetikai térképei kvalitatíve hasonlóak.

5.1.2. A ritka rekombináns kategóriák előfordulása R.meliloti 41-ben.

A négyszeres crossing over és génkonverzió azonos genotípusú utódokat /ritka rekombináns kategóriák/ eredményezhet. Elkülönítésük parciális diploid rendszerben nem lehetséges.

Az új pontok lokalizálása során végzett három pontos keresztezések lehetőséget adtak a négyszeres crossing overrel létrejött ritka rekombináns kategóriák vizsgálatára R.meliloti 41-ben. Az általam vizsgált régiók 4-16%-os kapcsoltságot mutattak /19.táblázat/. A leu-4 gly-1 régióban a közbülső met-168 allél a leu-4-hez van közelebb /70%-os kapcsoltság/, a met-331 a régió közepén helyezkedik el. A leu-4 his-210 régió esetében a közbülső met-168 a leu-4-hez mutat magasabb kapcsoltságot /leu-4 met-168 kapcsoltsága 67%, a met-168 his-210 kapcsoltsága 14%/, a cys-46 str-1 régió esetében a közbülső pur-1 marker a cys-46-hoz /cys-46 pur-1 kapcsoltsága

19. táblázat. Négyszeres crossing over gyakoriság R. meliloti 41-ben.

Donor	Reci- piens	Két szélső allél	Kap- csolt- ság %	Ellenszelektált/ szelektált marker	Négyszeres crossing over kategória	Négyszeres crossing over kategória elő- fordulása %/ a két szélső allélt örök- lő telepek százalé- kában
GY75	GY144	<u>gly-1 leu-4</u>	4	<u>str-3/gly-1⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-168⁺</u>	2
EV32	GY144	<u>gly-1 leu-4</u>		<u>pur-1/gly-1⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-331⁺</u>	1
EV32	GY144			<u>pur-1/gly-1⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-331⁺</u>	4
GY75	AK551	<u>his-210 leu-4</u>	8	<u>str-3/his-210⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-168⁺</u>	< 2
GY75	AK551			<u>str-3/his-210⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-168⁺</u>	< 2
GY75	AK551			<u>str-3/his-210⁺ leu-4⁺</u>	<u>met-168⁺</u>	2
EV23	EV119	<u>cys-46 str-1</u>	10	<u>his-210 pyr-2/cys-46⁺ str-1</u>	<u>pur-1⁺</u>	4
EV32	EV119			<u>met-331/cys-46⁺ str-1</u>	<u>pur-1⁺</u>	6
EV280	ZB201			<u>5FU-1/cys-46⁺ str-1</u>	<u>pyr-24⁺</u>	< 2
GY81	AK532	<u>cys-46 phe-15</u>	11	<u>str-3/cys-46⁺</u>	<u>pyr-29 phe-15</u>	3
EV80	GY493			<u>gly-1/cys-46⁺ phe-15⁺</u>	<u>pyr-29⁺</u>	< 4

19. táblázat, folytatás

Donor	Reci- piens	Két szélső allél	Kap- csolt- ság %	Ellenszelektált/ szelektált marker	Négyszeres crossing over kategória	A négyszeres crossing over kategória elő- fordulása /%/ a két szélső allélt öröklő telepek százalékában
EV270	EV197	<u>phe-15</u> <u>leu-4</u>	16	<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	2
EV272	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	< 1
EV220	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	< 2
EV214	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	< 2
AK974	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	< 2
AK972	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	2
AK208	EV197			<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	8
EV218	EV197	<u>phe-15</u> <u>leu-4</u>	16	<u>rif-5/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>his-1⁺</u>	5
EV112	AK550			<u>str-3/leu-4⁺</u>	<u>gly-1 phe-15⁺his-1⁺5FU-1</u>	8
EV112	AK550			<u>str-3/phe-15⁺</u>	<u>gly-1 leu-4⁺his-1⁺5FU-1</u>	2
EV112	AK550			<u>str-3/5FU-1</u>	<u>gly-1 leu-4⁺his-1⁺phe-15⁺</u>	3
EV112	AK550			<u>str-3/phe-15⁺leu-4⁺</u>	<u>gly-1 his-1⁺</u>	< 5

Meghatároztam a táblázatban feltüntetett két szélső marker kapcsoltságát és a köztük lévő marker négyszeres crossing overt igénylő alléljének öröklődését vizsgáltam. A táblázatban több ugyanazon keresztezés eredményét tüntettem fel.

60 %, pur-1 str-1 kapcsoltsága 13%/ , a pyr-24 pedig a str-1 hez /cys-46 pyr-24 kapcsoltsága 13%, pyr-24 str-1 kapcsoltsága 38%/ közelebb elhelyezkedő pont a kromoszómán. A cys-46 phe-15 régióban a közbülső pyr-29 marker középen helyezkedik el, a phe-15 leu-4 régió esetén ugyanaz igaz a his-1 markerre. A 19. táblázat adataiból az a következtetés vonható le, hogy a négyszeres crossing over meglehetősen ritka R.meliloti 41-ben, ha az E.coli-hoz viszonyítjuk. BÁNFALVI /1977/ E.coli-ban végzett R68.45 plazmidaal történt konjugációs kísérleteiben a négyszeres crossing over kategória 5-10-szer gyakoribb az általa vizsgált 58%-os kapcsoltságot mutató régióban, mint az általam vizsgált, maximum 16%-os kapcsoltságu régiókban R.meliloti 41 esetén. Rhizobium fágoknál OROSZ és mts. /1980/ kimutatták, hogy a tökéletlenül párosodó DNS- szálak javítása /mismatch repair/ 2-20-szor kisebb gyakoriságú, mint azt a lambda fágoknál tapasztalták. Elképzelhető, hogy a Rhizobium- ill. E.coli fágok esetében kimutatott különbségért felelős mechanizmus okozza a Rhizobium és E.coli között meglévő különbségeket a négyszeres crossing overrel képződő kategóriák esetében is.

5.2. Gyorstérképezési rendszer kidolgozása R.meliloti 41-ben.

A mutációk gyors és egyszerű lokalizálására R.meliloti 41-ben két rendszer áll rendelkezésünkre: a kromoszómát átfedő lét recipiensből álló sorozat, és az in vivo ill. in vitro előállított R-prime-ok.

5.2.1. Nem szelektálható fenotípusú mutációk térképezése.

A R.meliloti 41 szimbiotikus nitrogénkötéséért felelős gének nem szelektálható fenotípusúak, ezért kromoszómán való lokalizálásuk csak közvetetten lehetséges. Ezt a célt szolgálja a teljes kromoszómát átfedő hét recipiensből álló sorozat. Ismert térképhelyű mutációk újratérképezésével bizonyítottam, hogy a rendszer megbízható eredményeket ad. A nem szelektálható fenotípusú mutánsok térképezése most folyik.

A teljes kromoszómát átfedő recipiens rendszer teremtette meg a lehetőséget arra, hogy összehasonlítsuk a R.meliloti 41 és R.meliloti 2011 jelű törzsek kromoszómáját, és ezek a kísérletek vezettek arra a megállapításra, hogy a két R.meliloti törzs kromoszómája, legalábbis az R68.45 konjugációs rendszer hibahatárain belül, homológ /KONDOROSI és mts., 1980/.

5.2.2. R-prime-ok felhasználása mutációk gyors lokalizálására.

Az R-prime-oknak az a tulajdonsága, hogy a homológ régióból megnövekedett mértékű transzfert indítanak, lehetőséget adott arra, hogy ismeretlen mutációkat egy viszonylag szűk régióba lokalizálhassunk. Erre elsősorban a JOHNSTON és mts. /1978b/ által izolált, in vivo előállított R68.45-prime-ok voltak alkalmasak, elsősorban nagyobb számuk miatt. A laboratóriumunkban előállított in vitro RP4-prime-ok elvileg szintén felhasználhatók gyors térképezésre, de a gyakorlatban ehhez még nem rendelkezünk elegendő rekombináns RP4 plazmidaival, és így további RP4-prime-ok izolálása szükséges. Azt a következtetést azonban az eddigi RP4-prime-ok vizsgálatából is levonhattuk, hogy a

R.meliloti 41 kromoszómális DNS-ének fragmentjeit hordozó, in vitro előállított RP⁴-prime-ok képesek a homológ régióból polarizált transzfert indítani. Azt, hogy ezek az RP⁴-prime-ok valóban hordoznak beépült fragmentet, még biokémiai módszerrel bizonyítani kell. A beépült fragment méretének meghatározása talán arra is magyarázatot ad, hogy a pEV210 plazmiddal kapott rekombinációs értékek miért olyan alacsonyak. Feltételezhetjük, hogy a polarizált transzfer indításához a beépült fragmentnek bizonyos méretnél nagyobbnak kell lennie ahhoz, hogy kromoszóma mobilizációt indítson. Lehetséges, hogy az említett pEV210 beépült kromoszóma fragmentjének nagysága a küszöbhosszuság körül van. A polarizált transzfer- képesség vizsgálatakor azt is kimutattam, hogy az in vitro előállított R-prime-ok között, az in vivo izoláltakkal ellentétben, van olyan, amely az óramutató járásával megegyező, s olyan is, mely azzal ellentétes irányban indít polarizált transzfert. A homológ régió jelenléte tehát képessé teszi az egyébként R.meliloti 41-ben kromoszóma mobilizációra képtelen RP⁴ vektort a R.meliloti 41 kromoszómája megfelelő darabjai átjuttatására egyik sejtől a másikba.



6. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeimet a következőkben foglalom össze:

1./ A R.meliloti 41 jelenleg 45 pontból álló genetikai térképén 15 markert lokalizáltam.

2./ Megállapítottam, hogy a négyszeres crossing over kategória R.meliloti 41-ben meglepően ritka. Ennek alapján kidolgoztam nem szelektálható markerek /nodulációért és nitrogénkötésért felelős gének/ térképezésére egy jól használható genetikai rendszert, melynek használhatóságát szelektálható markerek /auxotrófia- és rezisztencia markerek/ lokalizálásával igazoltam.

3./ Ezt a genetikai rendszert felhasználtam a R.meliloti 41 és R.meliloti 2011 törzsek kromoszómájának összehasonlítására és megállapítottam, hogy a két Rhizobium törzs az R68.45 konjugációs rendszer feloldási szintjén homológ.

4./ Előállítottunk R.meliloti DNS-t tartalmazó R-prime-okat in vitro módszerrel. 31 transzferábilis RP4-prime kromoszóma mobilizációs képességét vizsgáltam és négyről kimutattam, hogy egy-egy adott /de RP4-prime-onként különböző/ régióból polarizált transzfert indítanak R.meliloti 41-ben.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Bachmann, B. J. /1979/: Linkage map of Escherichia coli K-12. Genetic Maps 1, 75-113.
- Bánfalvi, Zs. /1977/: Kísérletek térképezésre alkalmas RP⁴1, RP⁴-es plazmid variánsok előállítására. Térképezés az R68.45 plazmiddal. Szakdolgozat, JATE, SZBK.
- 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., Benyon, J. L., Johnston, A. W. B., Kondorosi, A., Vincze, E. /1980/: Genetic maps of Rhizobium leguminosarum, R.meliloti, R.trifolii and R.phaseoli. Genetic Maps 1, 134-135.
- Beringer, E. J., 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.
- Beringer, E. J., Hopwood, D. A. /1976/: Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum. Nature 264, 291-293.
- Brewin, N. J., Beringer, E. J., Buchanan-Wollaston, A. V., Johnston, A. W. B., Hirsch, P. R. /1980/: Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids. J.Gen.Microbiol. 116, 261-270.

- Casadesus, J., Olivares, J. /1979/: Rough and fine linkage mapping of the Rhizobium meliloti chromosome. Mol.Gen. Genet. 174, 203-209.
- Cavalli, L. L., Lederberg, J., Lederberg, E. M. /1953/: An infective factor controlling sex compatibility in Bacterium coli. J.Gen.Microbiol. 8, 89-103.
- Chandler, P. M., Krishnapillai, V. /1974/: Isolation and properties of recombination deficient mutants of Pseudomonas aeruginosa. Mutat.Res. 23, 15-23.
- Clark, A. J., Warren, G. J. /1979/: Conjugal transmission of plasmids. Annu.Rev.Genet. 13, 99-125.
- Clowes, R. C., Moody, E. E. /1966/: Chromosomal transfer from "recombination-deficient" strains of E.coli K-12. Genetics, 53, 717-726.
- Cole, M. A., Elkan, G. H. /1973/: Transmissible resistance to penicillin, neomycin and chloramphenicol in Rhizobium japonicum. Antimicrob.Chemoter.Agents 4, 248-253.
- Curtiss III, R., Renshaw, J. /1969/: Kinetics of F-transfer and recombinant production in F^+ x F^- matings in Escherichia coli K-12. Genetics 63, 39-52.
- Datta, N., Hedges, R. W. /1972/: Host ranges of R-factors. J. Gen.Microbiol. 10, 453-460.
- Datta, N., Hedges, R. W., Shaw, E. J., Sykes, R. B., Richmond, M. H. /1971/: Properties of an R factor from Pseudomonas aeruginosa. J.Bacteriol. 108, 1244-1249.

- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J., Hartman, P. E. /1966/: A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54, 61-76.
- Edwards, S., Meynell, G. G. /1969/: I sex factors and chromosomal recombination in Salmonella typhimurium. *Genet. Res.* 13, 321-323.
- Gilbert, W., Dressler, D. /1968/: DNA replication: the rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 473-484.
- Haas, D., Holloway, B. W. /1976/: R factor variants with enhanced sex factor activity in Pseudomonas aeruginosa. *Mol. Gen. Genet.* 144, 243-251.
- Hayes, W. /1952/: Recombination in Bacterium coli K-12: unidirectional transfer of genetic material. *Nature* 169, 118-119.
- Hayes, W. /1953/: Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in Bact. coli K-12. *J. Gen. Microbiol.* 8, 72-88.
- Hedges, R. W., Jacob, A. E., Crawford, I. P. /1977/: Wide ranging plasmid bearing the Pseudomonas aeruginosa tryptophane synthase genes. *Nature* 267, 283-284.
- Heumann, W. /1968/: Conjugation in starforming Rhizobium lupini. *Mol. Gen. Genet.* 102, 132-144.
- Higashi, S. /1967/: Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 391-403.

- Hirsch, P. R. /1979/: Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol. 133, 219-228.
- Holloway, B. W. /1978/: Isolation and characterization of an R' plasmid in Pseudomonas aeruginosa. J.Bacteriol. 133, 1078-1082.
- Holloway, B. W. /1979/: Plasmids that mobilize bacterial chromosome. Plasmids 2, 1-19.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V., Morgan, A. F. /1979/: Chromosomal genetics of Pseudomonas. Microbiol.Rev. 43, 73-102.
- Hu, S., Ohtsuto, E., Davidson, N. /1975/: Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of E.coli: structure of F-13 and related F-primes. J.Bacteriol. 122, 749-763.
- 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.
- Jacob, A. E., Cresswell, J. M., Hedges, R. W., Coetze, J. N., Beringer, J. E. /1976/: Properties of plasmid constructed by the in vitro insertion of DNA from Rhizobium leguminosarum and Proteus mirabilis into RP4. Mol.Gen.Genet. 147, 315-323.
- Johnston, A. W. B., Beringer, J. E. /1977/: Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature 267, 611-613.

- Johnston, A. W. B., Benyon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Setchell, S. M., Hirsch, P. R., Beringer, J. E. /1978a/: High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. *Nature* 276, 635-636.
- Johnston, A. W. B., Setchell, S. M., Beringer, J. E. /1978b/: Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and R.meliloti: formation of haploid recombinants and of R-primes. *J.Gen.Microbiol.* 104, 209-218.
- Julliot, J. S., Boistard, P. /1979/: Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in Escherichia coli and Rhizobium meliloti. *Mol.Gen.Genet.* 173, 289-298.
- Kiss, G. B., Dobó, K., Dusha, I., Breznovits, A., Orosz, L., Vincze, E., Kondorosi, A. /1980/: Isolation and characterization of an R-prime plasmid in Rhizobium meliloti. *J.Bacteriol.* 141, 121-128.
- Kiss, G. B., Vincze, E., Kálmán, Z., Forrai, T., Kondorosi, A. /1979/: Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in Rhizobium meliloti. *J.Gen.Microbiol.* 113, 105-118.
- Kondorosi, Á. /1977/: A nitrogénkötés genetikai elemzésére alkalmas rendszer létrehozása Rhizobium melilotiban. Kandidátusi értekezés, SZBK Genetikai Intézet.
- Kondorosi, A., Kiss, G. B., Forrai, T., Vincze, E., Bánfalvi, Z. /1977/: Circular linkage map of Rhizobium meliloti chromosome. *Nature* 264, 525-527.



- Kondorosi, A., Vincze, E., Johnston, A. W. B., Beringer, J. E. /1980/: A comparison of three Rhizobium linkage maps. Mol.Gen.Genet. 178, 403-408.
- Lederberg, J., Cavalli, L. L., Lederberg, E. M. /1952/: Sex comparability in E.coli. Genetics 37, 720-730.
- Lederberg, J., Lederberg, E. M. /1952/: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J.Bacteriol. 63, 399.
- Lederberg, J., Tatum, E. L. /1946a/: Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 113-114.
- Lederberg, J., Tatum, E. L. /1946b/: Gene recombination in E. coli. Nature 158, 558.
- Leemans, J., Villarroel, R., Silva, B., VanMontagu, M., Schell, J. /1980/: Direct repetition of a 1.2 Md DNA sequence is involved in site-specific recombination by the P1 plasmid R68. Gene 10, 319-328.
- Low, K. B. /1972/: Escherichia coli K-12 F-prime factors, old and new. Bacteriol.Rev. 36, 587-607.
- Meade, H. M., Signer, E. R. /1977/: Genetic mapping of Rhizobium meliloti. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74, 2076-2078.
- Moody, E. E., Hayes, W. /1972/: Chromosome transfer by autonomous transmissible plasmids: the role of the bacterial recombination /rec/ system. J.Bacteriol. 111, 80-85.
- Nishimura, Y., Caro, L., Berg, C. M., Hirota, Y. /1971/: Chromosome replication in Escherichia coli. IV. Control of

chromosome replication and cell division by an integrated episome. J.Mol.Biol. 55, 441-456.

Orosz, L., Páy, A., Dallmann, G. /1980/: Heterozygosis of phage 16-3 of Rhizobium meliloti: moderate level of mismatch repair or gene conversion. Mol.Gen.Genet. 179, 163-167.

Shapiro, J. A., Adhya, S. L., Bukhari, A. I. /1977/: Introduction: new pathways in the evolution of chromosome structure. In: Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., Adhya, S. L. /eds./: Insertion elements, plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y. pp. 3-11.

Smith, S. M., Ozeki, H., Stocker, B. A. D. /1963/: Transfer of col E₁ and col E₂ during high frequency transmission of colI in Salmonella typhimurium. J.Gen.Microbiol. 33, 231-242.

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



mit 4.000
Doktorarbeiten
130, -