

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

DR. KÁRPÁTI ÉVA

**KESZTHELY
2000**

VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
KESZTHELY

Doktori program: Szántóföldi növények tápanyagellátása és
termesztése

Doktori alprogram: A növények táplálkozását és a talajok
termékenységét befolyásoló tényezők alapismerete

Témavezetők:

DR. DEBRECZENI BÉLÁNÉ

MTA doktora

DR. OROSZ LÁSZLÓ

MTA doktora

**RIZS ÉS BÚZA NÖVÉNYEK EGYÜTTÉLÉSE
NITROGÉNKÖTŐ BAKTÉRIUMOKKAL**

Készítette:

DR. KÁRPÁTI ÉVA

KESZTHELY
2000

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
2. Célkitűzés	9
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. Az <i>Azospirillum</i> nemzetség	10
3.1.1. Az <i>Azospirillum</i> taxonómiája és morfológiája	10
3.1.2. Az <i>Azospirillum</i> anyagcseréje	11
3.1.2.1. Növényi hormon jellegű anyagok termelése és hatásuk a növényre	14
3.1.2.2. Az <i>Azospirillum</i> nitrogén anyagcseréje	15
3.1.2.2.1. Ammónia asszimiláció és aminosav bioszintézis	15
3.1.2.2.2. A nitrogénkötés élettana és genetikája	17
3.1.2.2.3. Nitrát asszimiláció	26
3.2. A <i>Herbaspirillum seropedicae</i> baktérium	26
3.2.1. A baktérium morfológiája és anyagcseréje	27
3.2.1.1. A baktérium nitrogénkötése és annak genetikai szabályozása	28
3.3. Az <i>Azospirillum</i> –gazdanövény együttélés kialakulása	29
3.3.1. Az együttélés kialakulásának genetikai háttere	35
3.3.2. A lektinek	37
3.3.2.1. A búza gyökérlektin, a búzacsíra agglutinin és szerepe az <i>Azospirillum</i> és búza kölcsönhatásban	39
3.4. Nitrogénkötő asszociációk a gyakorlatban: növényoltások és hasznuk	42
4. Anyagok és Módszerek	49
4.1. Molekuláris biológiai munkákhoz	49
4.2. Növénykísérletekhez	54
5. Eredmények	60

5.1. Az <i>A. lipoferum</i> kölcsönhatása a búza gyökérlektinnel, a búzacsíra agglutininnel (WGA) a nitrogénkötő asszociáció kialakulása során	60
5.1.1. Az <i>A. lipoferum</i> SpBr17R törzs random transzpozon mutagenezise	60
5.1.2. WGA-t nem kötő (WGA ⁻) mutáns törzs izolálása és jellemzése	61
5.1.3. A WGA-kötődés hatása a baktérium nitrogénkötésére	64
5.1.4. A baktériumsejt felszínén található cukorcsoportok részvétele a lektin indukálta nitrogénkötés serkentésben	68
5.1.5. A lektinkötődés hatása a <i>nifH</i> , <i>nifA</i> , <i>glnB</i> és <i>glnA</i> gének expressziójára	73
5.1.6. A WGA-kötő komponens kimutatása és izolálása a baktérium sejt kapszulájából	78
5.2. Nitrogénkötő asszociációk rizsben és búzában: az <i>A. brasilense</i> és a <i>H. seropedicae</i> baktériumok kölcsönhatása magyar rizs és búza fajtákkal	82
5.2.1. Pilóta kísérletek: optimális oltóbaktérium mennyiség becslés	82
5.2.2. A rögzített sejtes (immobilizált) oltóanyagok előállítása és jellemzése	84
5.2.3. Nitrogénkötő együttélések létrehozása és jellemzése	86
5.2.3.1. Rizs oltási kísérletek Karmina fajtával	87
5.2.3.2. Rizs oltási kísérletek Sandora és Ringola fajtával	92
5.2.3.3. Búza oltási kísérletek	95
6. Megvitatás	101
6.1. Az <i>A. lipoferum</i> kölcsönhatása a búza gyökérlektinnel, a búzacsíra agglutininnel (WGA) a nitrogénkötő asszociáció kialakulása során	101
6.1.1. A WGA-kötődés feltételezett szerepe a nitrogénkötés szabályozásában	103

6.1.2. Specifikus cukor struktúrák a baktérium sejtfelületén és szerepük a nitrogénkötés fokozásában	108
6.1.3. A baktérium feltételezett WGA–kötő receptoráról	110
6.1.4. A WGA/receptor és a Nod faktor/receptor rendszer	111
6.2. Nitrogénkötő asszociációk rizsben és búzában: az <i>A. brasilense</i> és a <i>H. seropedicae</i> baktériumok kölcsönhatása magyar rizs és búza fajtákkal	116
7. Összefoglalás	127
8. Résumé	129
9. Irodalomjegyzék	132

1. Bevezetés

A növények egyik legfontosabb kémiai tápeleme, a termés mennyiségének és minőségének egyik fő meghatározója a nitrogén. Az intenzív gabonatermesztési technológiák nagy mennyiségű nitrogén műtrágya alkalmazását követelik meg, hiszen a talaj szerves és szervesetlen nitrogén vegyületei messze nem elegendők a növekvő termésmennyiség igények fedezésére. A nitrogén műtrágya költsége jelentősen befolyásolja a termelés gazdaságosságát. De nap, mint nap szembesülnünk kell azzal is, hogy a nitrogén műtrágyázás a környezetet, élőhelyünket is óriási mértékben megterheli. A nitrát felhalmozódás a talajvizekben, felszíni és ivóvizeinkben egyre komolyabb népegészségügyi problémát jelent. A tudomány még nem találta meg a nyitját, hogyan tudnánk a növények nitrogéntáplálását teljes egészében környezetbarát módon megvalósítani, de ha már a nitrogén műtrágyának csak egy részét ki tudjuk váltani biológiai nitrogéntáplálással, az már jelentős előrelépés lehet.

A probléma egy ígéretes megoldása a biológiai nitrogénkötés felhasználása növények és mikroorganizmusok olyan együttélésében, amelyben a mikroorganizmus a levegő nitrogénjét köti meg, alakítja át ammóniává, és ezzel táplálja a növényt.

A biológiai nitrogénkötés hallatán először a hüvelyes növények és a gyökerükön gyökérgümőkben élő *Rhizobium* baktériumok nitrogénkötő szimbiózisára gondolunk, vagy az árasztott rizskultúrákban évtizedek óta használt *Azolla-Anabaena* szimbiózisokra.

Mintegy 20 éve, a kutatás egyre inkább a gabonafélék és fűfélék gyökérkörnyezetében, gyökerében természetes körülmények között is élő nitrogénkötő, növénynövekedést serkentő talajbaktériumokra terelődik, valamint belőlük oltóanyagok fejlesztésére irányul a munka. Ilyen baktériumok az *Azospirillum* fajok, melyek a gabona- és pázsitfűfélék gyökereinek felszínén élnek, egyesek a gyökérbelsőben, szárbelsőben is megtelepszenek. A rizsben talált *Herbaspirillum* baktérium endofita nitrogénkötő, a talajban nem, csak gazdanövénye belső szöveteiben él.

Egyes EU országokban, gabonakultúrákban, az azospirillumok egyedi és kevert oltóanyagait már évek óta nagy mennyiségben használják talajoltásra. 10–30 %-kal kevesebb nitrogén műtrágya felhasználás mellett 5–30 % termésnövekedést is elértek. Bár az is vitathatatlan, hogy az oltóanyagok hatékonysága évről évre, az időjárási- és talajviszonyoktól függően, bizony változó (összefoglalva Okon és Labandera-Gonzales, 1994; Okon és mtsai., 1995).

Magyarországon is ígéretes megoldás lehet az *Azospirillum* és *Herbaspirillum* oltóanyagok arra, hogy ezeket, a hazai talajokban igen alacsony számban élő hasznos baktériumokat feldúsítsuk, és munkára fogjuk. Ehhez azonban körültekintően kell megbecsülnünk várható hatékonyságukat, és nemcsak a hazai éghajlati, időjárási és talajviszonyok mellett. Ismernünk kell a magyar gabonafajták hajlamát is, képesek-e velük hatékony nitrogénkötő asszociációban élni.

Hatékony *Azospirillum*–búza nitrogénkötő asszociáció létrehozásához és működtetéséhez alapvető, hogy megismerjük a növény és a baktérium között, az asszociáció kialakulása során lejátszódó

biológiai eseményeket is. Dolgozatom első részében ennek a jórészt még fekete doboznak egy szögletébe, az *Azospirillum* baktérium és a gyökérfelszín egy "jelmolekulája", a gyökérlektin közötti molekuláris kölcsönhatásokba kapunk betekintést.

Dolgozatom második részének témája három magyar rizs- és egy magyar búzafajta jellemzése nitrogénkötő együttélésben *Azospirillum* és *Herbaspirillum* baktériumokkal.

2. Célkitűzés

Munkám első részében az *Azospirillum* és búza együttélés kialakulásának egyik elemét, a búza gyökérfelszín és a baktérium sejtfelszín kölcsönhatását vizsgáljuk:

- bemutatjuk a gyökérfelszínen expresszáladó gyökérlektin, a búzacsíra agglutinin és a baktérium sejtfelszín közötti felismerési folyamatot;
- leírjuk a lektin baktériumhoz kötődésének hatását a baktérium nitrogénkötésére;
- vizsgáljuk a lektinkötődés kiváltotta jel kapcsolatát a nitrogénkötés szabályozási rendszerével a baktériumban;
- és lektinkötő receptort keresünk a baktérium sejtfelszínén.

Munkám második részében:

- nitrogénkötő asszociációt hozunk létre három magyar rizs- és egy magyar búzafajta, valamint az asszociatív *A. brasilense* és az endofita *H. seropedicae* nitrogénkötő, növénynövekedést serkentő baktériumok között;
- jellemezzük a nitrogénkötő együttéléseket:
 - leírjuk a baktériumok megtelepedését a növényeken belül, és hatásukat a növények növekedésére, mint az asszociációnak a következményét;
 - leírjuk a fajták tűrőképességét, hajlamát a baktériumokkal való együttélésre és fogékonyságát az együttélés jótékony hatásának kihasználására;
- bemutatunk egy sejt immobilizációs oltóanyag előállítási technikát, amelynek során cellulózgyöngyön rögzítjük az oltóbaktériumokat, valamint jellemezzük a rögzített sejtes oltóanyagok hatékonyságát.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az *Azospirillum* nemzetség

3.1.1. Az *Azospirillum* taxonómiája és morfológiája. Az *Azospirillum* nemzetség a *Proteobacterium*-ok α -alosztályának első csoportjába, ezen belül a *Rhodospirillaceae* családba tartozik (Gillis és Reinhold-Hurek, 1994). A nemzetség tagjai talajlakó, aerob, nitrogénkötő baktériumok. Asszociatív nitrogénkötő szimbiózisban élnek gabona- és pázsitfűfélék gyökerén. Biológiaiilag kötött nitrogénnel táplálják, és növényi hormon jellegű anyagok termelésével is serkentik a gazdanövény növekedését. Mindezt a nitrogénkötő, növény-növekedést serkentő rizobaktériumok (Nif-PGPR) közé is sorolják őket (összefoglalva Klopper, 1994).

A nemzetségbe tartozó első baktériumot Beijerinck (1925) írta le és először *Azotobacter spirillum*-nak, majd *Spirillum lipoferum*-nak nevezte el. Majd megfedkezett a tudományos világ a baktériumról. Az 1970-es években fedezték fel újra Braziliában, amikor asszociatív nitrogénkötő baktériumok után kutattak a *Digitaria* és a kukorica rizoszférájában (Dobereiner és Day, 1975). Később más éghajlati zónákban is megtalálták őket, a trópusi, szubtrópusi övezettől a hideg mérsékelt övi zónákig (Dobereiner, 1992). Eddig öt *Azospirillum* fajt írtak le, ezek az *A. brasilense*, *A. lipoferum* (Tarrand és mtsai., 1978), *A. amazonense*, *A. halopraeferens* és az *A. irakense*. Ezek egymástól ökológiai tűrőképességükben, gazdanövény körükben, morfológiájukban, flagelláltságukban, valamint sejtjeik fehérjéinek kétdimenziós

SDS–poliakrilamid gél elektroforézissel meghatározott mintázataiban térnek el (összefoglalva Gillis és Reinhold-Hurek, 1994). A két legjobban leírt faj az *A. brasilense* és az *A. lipoferum*, és ők a mikrobiológiai és genetikai kutatások középpontjai is.

Az *Azospirillum* Gramm-negatív, hajlított pálcika alakú (0,8–1,0 μm széles, 2,0–4,0 μm hosszú) baktérium (1. ábra). Kétféle flagellummal rendelkezik: változó számú és méretű peritrich flagellával, melyeket csak szilárd táptalajon, és egyetlen poláris flagellummal, melyet szilárd és folyadék tápközegben is növeszt. DNS állományának G+C tartalma 69–70 % (Tarrand és mtsai., 1978).

1. ábra. Az *A. brasilense* elektronmikroszkópos képe (10000 \times nagyítás) (M. de Zamaroczy jóvoltából).

3.1.2. Az *Azospirillum* anyagcséréje (összefoglalva Hartmann és Zimmer, 1994). Az *Azospirillum* fajok, anyagcséréjüket nézve sokoldalúak. Kemoorganotróf, aerob baktériumok. Képesek megkötni a

légköri nitrogént mikroaerob feltételek mellett. Képesek nitrát redukcióra is, amikor az oxigén korlátozottan áll rendelkezésre. Különböző szénforrásokból termelik energiájukat. Legjobb hatásfokkal a szerves savakat (almasav, tejsav) metabolizálják. Almasav és oxálsav hasznosító képességük a gyökérkolonizációjukat is támogatja (Reinhold és mtsai., 1985). A fajok eltérően hasznosítják a cukrokat, az *A. lipoferum* képes felhasználni a glükózt, az *A. brasilense* nem. Alkoholokat és biopolimereket (keményítő, cellulóz, xylán) is hasznosítanak szénforrásként. A baktériumok metabolizálható tápanyagforrásaik felé kemotaxissal vándorolnak, a tápanyagok koncentráció gradiense mentén, míg aerotaxissal keresik meg az anyagcsere állapotuknak legmegfelelőbb oxigén koncentrációt.

Energia- és szénforrás raktározás céljából poli- β -hidroxibutirátot (PHB) halmoznak föl, ha a sejtben magas a C/N arány és a respirációs lánc számára, oxigén vagy nitrát alakban, kevés terminális elektronakceptor molekula áll rendelkezésre. A felhalmozódásban inkább a rendelkezésre álló oxigénmennyiség a meghatározó, semmint a nitrogénhiány. A PHB raktározás segíti a baktérium megélését mikroaerob körülmények között, mint például nitrogénkötéskor, és növeli a baktérium szárazságtűrését is.

Kedvezőtlen környezeti körülmények között az *Azospirillum C-* (cyst) típusú, nagy, kerek sejteket képez. Ezek főleg a rizoszférában fellépő szárazságstressz hatására keletkeznek, majd a stresszhatás elmúltával képesek visszaalakulni vegetatív formává (Bashan és munkatársai, 1991).

Mindezek a tulajdonságok segítik a baktériumokat a rizoszféra különleges mikroökológiájához való alkalmazkodásban, abban, hogy érzékelni és értékelni tudják a gyökér és a gyökérkörnyezet jeleit, vagyis hogy sikeres versenytársak legyenek a rizoszféra mikroorganizmusok között, a növényvel való együttélésben.

Az *Azospirillum* fajoknak a növény növekedésére gyakorolt kedvező hatása döntően három tényezőnek az eredője (összefoglalva Hartmann és Zimmer, 1994): a baktérium

- nitrogénkötésének, és ennek révén a növény levegőből kötött nitrogénnel való táplálásának;
- fitohormon jellegű anyagok termelésének, melyek a növény növekedését serkentik;
- és nitrát redukciójának, amelynek egy köztes terméke, a nitrit szintén növekedési hormon jellegű hatással van a növényre.

Fontossági sorrendet a három tényező között megállapítani nagyon nehéz, a talaj, a növény és a baktérium együtthatásának eredője hol az egyik, hol a másik tényezőt részesítheti előnyben.

A növénynövekedést serkentő hatás a gyökérzet erőteljesebb fejlődésében, a gyökértömeg gyarapodásában, a laterális gyökerek számának és méretének növekedésében nyilvánul meg. A nagyobb gyökérfelület nagyobb tápanyagfelvevő kapacitást ad a növénynek. A gyökértömeg mellett a zöldsöveg és a termés mennyiség is gyarapodhat (Tien és mtsai., 1979; Kapulnik és mtsai., 1985).

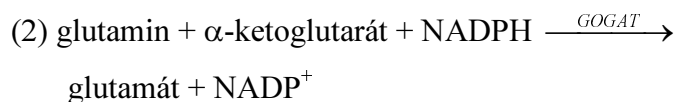
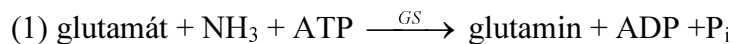
3.1.2.1. Növényi hormon jellegű anyagok termelése és hatásuk a növénynövekedésre (összefoglalva Hartmann és Zimmer, 1994). A növényi hormonok, köztük az auxinok és citokininek, döntő szerepet játszanak a növényi sejtek totipotenciájának megnyilvánulásában, a növények élettani folyamatainak szabályozásában. Az auxin és citokinin arány a sejtben a sejt differenciálódást, a szövetekben az organogenezist szabályozza (Leyser és Berleth, 1999). Auxin hatására a növényi sejtekben visszaállhat a dedifferenciált állapot. A citokininek sejtosztódást és kallusznövekedést idéznek elő (Miller és mtsai., 1961).

A. brasilense és *A. lipoferum* tenyészetekben auxinokat, citokinineket és gibberellineket azonosítottak (Tien és mtsai., 1979, Bottini és mtsai., 1989). Mások citokinin-szerű anyagokat csak idős *Azospirillum* kultúrákban mutattak ki, ahol azonban azok a nukleinsavak lebomlási termékei is lehetnek. Enzimatis úton történő citokinin termelésre nincs még bizonyíték. Az *A. brasilense* baktériumban három indol-3-ecetsavat termelő alternatív bioszintézis utat közöltek: az indol-3-acetamid (IAM) szintézis út és az indol-3-piruvát (IPyA) szintézisút triptofán-függő. Egy triptofántól nem függő szintézis út is működik, de ezt még nem jellemezték (összefoglalva Costacurta, 1995). A baktérium képes a növényi triptofánt is indol-3-ecetsavvá alakítani és kiválasztani a növénybe. Indol-3-ecetsavat túltermelő *A. brasilense* mutáns törzs a cirokban jobban serkentette a gyökérnövekedést, mint a vad típus, búzában és zabban azonban nem. Indol-3-ecetsavat alig termelő mutánsok gyökérnövekedést serkentő hatása lecsökkent.

Az *A. brasilense* oltás hasonló hatást váltott ki, mint az indol-3-ecetsav (IAA), kinetin és gibberellinsav (GA3) keverékkel való kezelés. Michiels és mtsai. szerint (1994) a növénynövekedés serkentésért döntően az auxinok a felelősek. A kukorica gyökerében 10^7 sejt/növény számban megtelepedett *A. brasilense* már mérhetően növelte az összes indol-3-ecetsav mennyiséget a növényben (összefoglalva Fallik és mtsai., 1994).

3.1.2.2. Az *Azospirillum* nitrogén anyagcseréje (összefoglalva Hartmann és Zimmer, 1994). A baktérium többféle nitrogénforrást képes hasznosítani. A talajból felvehető ammóniát, nitrátot, nitritet, szerves nitrogéntartalmú vegyületeket, a légköri nitrogént ammóniává redukált formában egyaránt képes nitrogén-anyagcseréjébe bevonni (2. ábra).

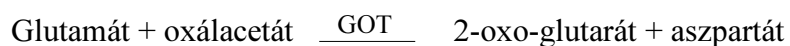
3.1.2.2.1. Ammónia asszimiláció és aminosav bioszintézis. Az ammónia asszimilációja a következő folyamatokban zajlik:



Nitrogénkötési körülmények között az ammónia beépítést főleg a glutamin-szintetáz (GS) (1) és a glutamát-szintáz (GOGAT) (2) enzim katalizálja (Okon és mtsai., 1976). Kisebb részét a glutamát-dehidrogenáz (GDH) (3) alakítja glutamáttá (Westby és mtsai., 1987). A reakciókban az elsődleges NH_4^+ akceptor a glutamát, a másodlagos az α -ketoglutarát (2-oxoglutarát).

2. ábra. Nitrogén asszimiláció *Azospirillum*-ban. GS, glutamin szintetáz; GOGAT, glutamát szintáz; GDH, glutamát dehidrogenáz; GPT, glutamát piruvát transzamináz; GOT, glutamát oxálacetát transzamináz; aNR, asszimilációs nitrát reduktáz; dNR, disszimilációs nitrát reduktáz; aNI, asszimilációs nitrit reduktáz (Hartmann és Zimmer, 1994).

Nagymennyiségű külső ammóniaforrás jelenlétében a GDH-nak a részvétele a jelentős az NH_4^+ asszimilációjában. Amikor pedig a glutamát a fő nitrogén forrása a sejtnek, akkor a GDH, a GOT (glutamát-oxálacetát-aminotranszferáz) és a GPT (glutamát-piruvát-aminotranszferáz) enzimek mutatnak nagy aktivitást:

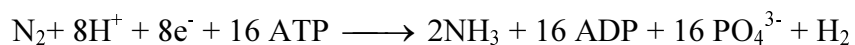


A fenti folyamatok termékeiből, további enzimatikus lépések sorozatán keresztül, más aminosavak, nukleinsavak és egyéb N-tartalmú molekulák szintetizálódnak (2. ábra).

3.1.2.2.2. A nitrogénkötés élettana és genetikája (összefoglalva Hartmann és Zimmer, 1994; de Zamaroczy, 1995). Az *Azospirillum* baktérium a növényel asszociációban és a talajban szabadon élve is képes nitrogénkötésre. Nitrogénhiányos vagy nitrogénmentes környezetben, mikroaerob körülmények között, a levegő molekuláris nitrogénjét, nitrogenáz enzimje segítségével, ammóniává redukálja. A nitrogénmentes táptalajban tenyésztett baktérium nitrogénkötéséhez az optimális pH tartomány 6,0–7,3. A nitrogénkötésben meghatározó környezeti tényező az oxigén koncentráció és a kötött nitrogén mennyisége. Az *A. brasilense* 0,1 kPa, az *A. lipoferum* 0,5 kPa parciális O_2 nyomás mellett köti legaktívabban a nitrogént (Okon és mtsai., 1976). A kötött nitrogén mennyiségét illetően, 0,05 mmol ammónium-klorid koncentráció a sejtkörnyezetben már elnyomja a nitrogénkötést, a gátlás reverzibilis (Hartmann és mtsai, 1986). Továbbá, anaerob körülmények

vagy túl sok oxigén is gátolja a nitrogénkötést, miközben irreverzibilisen inaktiválódik a nitrogénáz enzim.

A nitrogénáz enzim egy komplex, két alkotórésze a dinitrogenáz (molibdén-vas-protein) és a dinitrogenáz-reduktáz (vas-protein). A dinitrogenáz molekulán található az aktív hely, ahol a N_2 redukció végbemegy:



Az enzim molekulája tetramer ($\alpha_2\beta_2$) szerkezetű, működéséhez molibdént és vasat használ kofaktorként. A dinitrogenáz-reduktáz szállítja a redukciós folyamathoz szükséges elektronokat a dinitrogenázhoz. Az enzim homodimer (α_2) szerkezetű, kofaktora vas.

A nitrogénkötés szabályozása két szinten nyilvánul meg, a sejt N-státuszának és oxigén ellátottságának megfelelően: egyrészt gén átíródsági (transzkripció) szinten, amikor is az enzim bioszintézise szabályozott, másrészt a termelődött enzim molekulák aktivitását is szabályozza a baktérium poszt-transzlációs módosításokkal.

A nitrogénkötés transzkripció szabályozása (3. ábra). A nitrogénáz enzim struktúrgénjeit hordozó *nifHDK* operon a baktériumban a kromoszóma DNS-en helyezkedik el. Szomszédságában további, a nitrogénkötéshez elengedhetetlen géneket írtak le: a *draGT*, *nifE*, *nifUS*, *nifW*, *fixABC* géneket. A régiótól elkülönülten, de szintén a kromoszómán található a *nifA* és *nifB* gén, valamint a *glnBA* cluster is (összefoglalva de Zamaroczy, 1995).

A *nifHDK* három génje egy transzkripció egységet alkot (Perroud és mtsai, 1985). A *nifH* gén terméke a dinitrogenáz-reduktáz, a *nifDK* gének termékei pedig a dinitrogenáz α és β alegységei. A *nifHDK* operonról csak nitrogénkötési körülmények között (mikroaerob és nitrogénmentes környezet) folyik transzkripció (de Zamaroczy és mtsai, 1989). A gének egy közös, σ^{54} -függő promoterről íródnak át. Az átíródás megindulásához egy aktivátor fehérje, a NifA kötődése szükséges egy, a promoter előtt elhelyezkedő specifikus DNS szakaszhoz, az "upstream" aktivátor szekvenciához (upstream activator sequences, UAS).

A NifA fehérje a *nifA* gén terméke. A gén konstitutívan íródik át, tehát nemcsak a nitrogénkötésnek megfelelő körülmények között, hanem magas oxigén koncentráció és/vagy ammónia jelenlétében is, de transzkripciója a nitrogénkötési feltételek mellett teljes. A gén promoter régiójában σ^{70} -RNS polimeráz kötőhelyhez hasonló szekvencia található (Fadel-Picheth és mtsai., 1999). Megnyilvánulásához nincs szükség az NtrB/NtrC szabályozó rendszerre. A NifA fehérje inaktív formában szintetizálódik, és a nitrogénkötés feltételei mellett aktiválódik (3. és 4. ábra). Az aktív forma vesz részt a *nifHDK* transzkripció beindításában. Aktiválódása nem poszttranszlációs kovalens módosítással történik. Aktiválási folyamatában a *glnB* gén kódolta P_{II} fehérje vesz részt, uridilált, aktív formában (de Zamaroczy és mtsai., 1993). A NifA N-terminális doménje a molekula inaktív formában tartásában vesz részt,

ammónia túlsúly esetén. Nitrogénkötési körülmények között, feltehetőleg a P_{II} fehérje az (vagy egy, a P_{II} szabályozása alatt álló, még ismeretlen elem), amely megakadályozza az N-terminális gátlást a molekulában, egy ismeretlen mechanizmus révén (Arsene és mtsai., 1996). Az N-terminális domén Tyr-18 pozíciója kulcsfontosságú a fehérje aktivitásának gátlásában, mert ennek mutációja az aktiváláshoz P_{II} fehérjét nem igénylő, aktív NifA fehérjét ad nitrogénkötési körülmények között (Arsene és mtsai., 1999).

A P_{II} fehérjét a *glnB* gén kódolja. A gén expressziója elengedhetetlen a nitrogénkötéshez. Null mutációja esetén a *nifHDK* génekről nem történik transzkripció, a *nifA* gén átírása azonban nem csökken. A P_{II} fehérje a sejt N-státuszának központi érzékelő és jelátvivő eleme, funkcióját feltehetően a glutamin/ α -ketoglutarát arány mérése révén végzi. A sejt N-státuszától függően a fehérje reverzibilisen uridilálódik. A fehérje szintézise a sejt nitrogén ellátottságának függvényében alakul (de Zamaroczy és mtsai., 1993). A *glnB* gén közös átírási egységben van a glutamin szintetázt (GS) kódoló *glnA* génnel (3. és 4. ábrák). A *glnBA* operon három, N-szabályozott promoterral rendelkezik. A *glnB* géntől felfelé két átfedő promoter van, a σ^{70} -függő *glnBp1* és a σ^{54} -függő *glnBp2*. A *glnA* gén saját promoterral is bír, melyet egy σ^{54} -től eltérő, nem ismert σ faktor szabályoz. A sejt nitrogén és oxigén ellátottságától függően, az egyes promoterekről az átírás eltérő aktivitással folyik. Nitrogénmentes, mikroaerob körülmények között a *glnBp2* promoterről *glnBA* mRNS íródik át, míg a *glnA* saját promotereéről alig nyilvánul meg. A termelődött P_{II} fehérje uridilálódik.

Az uridiláló enzim és génje még nem ismert. A P_{II} -UMP aktiválja a NifA fehérjét, ami aztán a *nifHDK* gének átírását kapcsolja be. A P_{II} -UMP feltehetőleg a *glnBp2* promoter szabályozásába is belép, egy még ismeretlen (X) fehérje aktiválása révén. Nitrogén túlsúly esetén a *glnBp2* represszált, *glnBA* mRNS kis mennyiségben a *glnBp1* promoterről készül. A *glnA* saját promoterének aktivitása megnő. A P_{II} fehérje nem uridilálódik, nem aktiválja a NifA-t, a nitrogénáz gének nem íródnak át. Feltehetőleg nem aktiválja az X fehérjét sem, így saját szintézisét a *glnBp2* promoterről is gátolja.

A P_{II} fehérjének a GS aktivitás szabályozásában nincs szerepe. A P_{II} jelzést továbbít a sejt N-státuszáról az NtrB/NtrC rendszerhez, feltehetőleg úgy, hogy részt vesz az NtrC fehérje defoszforilált formában tartásában, ammónia túlsúly esetén. Így közvetve tehát, az NtrC révén, szerepe van a nitrogénáz enzim inaktiválásában, továbbá a *glnZ* expresszió gátlásában, a nitrát asszimiláció elnyomásában (3. ábra). Szerepet játszik a sejtben a C/N metabolizmus koordinálásában is és részt vesz a sejt mozgékonyágának szabályozásában (de Zamaroczy és mtsai., 1996; de Zamaroczy, 1998).

A *glnZ* gén a *glnB* génnek egy szekvencia homológja, a *glnB* gén második kópiájának is tartják (3. ábra). Terméke, a P_Z fehérje. Sejtbeni funkciója eltér a P_{II} -étől, nagyfokú szerkezeti hasonlóságuk ellenére is. A gén nitrogénkötési és ammónia asszimilációs körülmények között is megnyilvánul. Promotere σ^{54} -függő és nitrogénkötéskor a foszforilált NtrC aktiválja. Expressziója ammónia túlsúlyban is függ az *ntr* rendszertől. A P_Z fehérje nitrogénkötési feltételek mellett reverzibilisen

uridilálódik (4. ábra). Funkciójáról még alig tudunk. A GS reverzibilis modifikációjához nem szükséges, negatívan szabályozza a metilammónium transzportot a sejtbe, és szerepe van a C/N metabolizmus koordinálásában (de Zamaroczy, 1998).

A glutamin szintetázt (GS) kódoló *glnA* gén átírásának szabályozását előbb már tárgyaltuk (3. és 4. ábra). A szabályozásban az NtrB/NtrC rendszer nem vesz részt. Az enzim aktivitását reverzibilis adeniláció szabályozza a sejt N-státuszának megfelelően. A nitrogénkötés feltételei mellett az enzim nem-adenilált formában működik. Ha a sejt nitrogénforrása túlsúlyban ammónia, akkor az enzim adenilációval inaktiválódik. Az adenilációs folyamatban résztvevő enzimeket még nem jellemezték. A P_{II} fehérje nem kapcsolódik be az enzim aktivitásának alakításába.

Az *ntrA* (*rpoN*) gén kódolja a specifikus RNS-polimeráz szigma faktort, a σ^{54} -et (3. ábra). A gén működése elengedhetetlen a nitrogénkötéshez. Az *ntrB* és *ntrC* gének az NtrB/NtrC kétkomponensű hisztidin kináz/válasz- szabályozó rendszer elemeit kódolják. Megnyilvánulásuk nem elengedhetetlen a nitrogénkötéshez. Az NtrB reverzibilisen foszforilálja az NtrC-t, a sejt N-státuszának megfelelően (3. ábra). Az NtrC nem vesz részt a *nifA*, *glnA* és *glnB* gének megnyilvánulásának szabályozásában, de a fehérje foszforilált formában szükséges a *glnZ* átíródásához, nitrogénkötési feltételek mellett (Zhang és mtsai., 1997). Nem vesz részt a GS aktivitás szabályozásában sem. Viszont belép a dinitrogenáz reductáz kovalens módosításának

folyamatába, vagyis a nitrogénáz enzim inaktiválásába, ammónia túlsúly esetén.

A *nif* gének expressziójának oxigénszabályozása alig ismert. Az oxigén feltehetőleg közvetlenül a NifA fehérje aktivitásának szabályozásában vesz részt (Zhang és mtsai., 1997). A NifA fehérje központi és C-terminális doménje közötti linker tartalmazza az enzimmolekula oxigén érzékenységéért felelős konzervatív cisztein motívumot (Liang és mtsai., 1991).

A nitrogénáz enzim aktivitás poszt-transzlációs szabályozása (összefoglalva Zhang és mtsai., 1997). A környezeti viszonyokhoz való gyors alkalmazkodást poszt-transzlációs enzimaktivitás szabályozás végzi. A szabályozást, a dinitrogénáz-reduktáz kovalens módosításával, az ADP-ribozil-transzferáz/dinitrogénáz-reduktáz-aktiváló-glikohidroláz (DraT/DraG) enzimrendszer végzi (3. ábra). Ammónia túlsúly vagy anaerobiózis esetén a DraT a dinitrogénáz-reduktázhoz ADP-ribózt kapcsol, ezzel az enzimet inaktiválja. Nitrogénkötési feltételek mellett a DraG az ADP-ribózt lehasítja és visszaállítja az enzim aktív konfigurációját.

A DraT/DraG rendszer mellett más szabályozó rendszerek működése is feltételezett: nagy oxigénkoncentráció mellett gyors és reverzibilis, valamint magas ammónia koncentráció mellett részleges nitrogénáz aktivitás gátlás következik be. Mindkét szabályozás a dinitrogénáz reduktáz kovalens módosítása nélkül történik.

Az *A. lipoférum* nitrogénkötésének szabályozásáról kevés a tudásunk. A *nifHDK* operon *nifA*-szerű szabályozás alatt áll (Fahsold és

mtsai., 1985). A *glnBA* operon leírt. A P_{II} fehérjét még nem jellemezték a baktériumban. A DraT/DraG és NtrB/NtrC kettős szabályozó rendszerek az *A. brasilense*-ben leírt mechanizmusokkal működnek (Elmerich és mtsai., 1991).

3.1.2.2.3. Nitrát asszimiláció. Ammónia hiányában az *Azospirillum* nitrátot (vagy nitritet) is képes nitrogénforrásként használni (2. ábra). Az asszimiláció a nitrát nitritté, majd annak ammóniává történő redukálásával játszódik le. Az ammónia pedig végül az aminosav szintézisben használódik fel. A nitrát asszimiláció ellentétes a nitrát disszimiláció folyamatával, ahol a nitrát a respirációs lánc elektron akceptora és a redukció termékei, a N₂O és a N₂ nem metabolizálódnak tovább, mint nitrogén forrás. A két folyamatnak csak az első lépése egyezik meg, azaz a nitrát átalakítása nitritté (összefoglalva: Hartmann és Zimmer, 1994).

3.2. A *Herbaspirillum seropedicae* baktérium

A *Herbaspirillum* nemzetség rendszertanilag a *Proteobacteriumok* β -alosztályába tartozik. A nemzetség két faja, a *H. seropedicae* és a *H. rubrisubalbicans* nitrogénkötésre képes (Baldani és mtsai., 1986a).

A *H. seropedicae* baktériumot rizs magvakból, a cukornád gyökeréből, szárából és leveléből izolálták. A talajban nem találták meg (Dobereiner és mtsai., 1993). Kimutatták gyökérrel asszociációban is cirokban, kukoricában és rizsben. Feltételezik, hogy a baktérium növényi magvakkal is terjed (Baldani és mtsai., 1996). Cirokban és kölesben néha

patogénként is viselkedik, a cukornádban azonban sosem (Dobereiner és mtsai., 1993).

3.2.1. A baktérium morfológiája és anyagcseréje. A *Herbaspirillum* Gram-negatív, vibroid alakú baktérium. Az *Azospirillum*-nál kisebb (0,6–0,7 µm széles, 1,5–5 µm hosszú). Változó számú flagellát visel a sejt egyik vagy mindkét pólusán (Baldani és mtsai., 1986a) (5. ábra).

5. ábra. A *H. seropedicae* elektronmikroszkópos képe (10000× nagyítás) (Dobereiner, 1992).

DNS-ének G+C tartalma kisebb, mint az *Azospirillumé* (64–65 mol %) (Baldani és mtsai., 1996).

Kemoorganotróf, aerob baktérium. Megköti a légköri nitrogént és nitrát asszimilációra is képes, korlátozott oxigén ellátás mellett. Szénforrásként főleg szerves savakat, malátot, fumarátot, szukcinátot, piruvátot és citrátot fogyaszt, de szénhidrátokat, glükózt, galaktózt,

arabinózt, mannitolt, szorbitolt és glicerolt is képes hasznosítani. Nitrogénkötési körülmények között 34 °C-on nő jól. 22 °C alatt vagy 38 °C felett nem szaporodik. (Baldani és mtsai., 1986a). A baktérium növénynövekedést serkentő hatása bizonyított (Dobereiner és mtsai., 1993; Rethati és mtsai., 2000), de a serkentés mechanizmusa és a serkentő molekulák milyensége még nem ismert.

3.2.1.1. A baktérium nitrogénkötése és annak genetikai szabályozása. A *H. seropedicae*, az *Azospirillum*-hoz hasonlóan, szintén mikroaerob nitrogénkötő baktérium. 0,04–0,2 kPa parciális nyomás mellett, azaz alacsonyabb oxigén koncentrációnál köti a nitrogént, mint az *Azospirillum*. A nitrogénkötéséhez optimális pH tartomány tágabb (pH 5,3–8,0) (Baldani és mtsai., 1986a). Nitrogenáz enzimének aktivitását, csakúgy, mint az *Azospirillum*nál, a környezet nitrogén ellátottsága is befolyásolja, 0,2 mmol ammónium–klorid gyors, reverzibilis gátlást okoz). Nitrogenáz enzime szintén oxigén érzékeny.

A *H. seropedicae* *nif* génjei két régióba szerveződnek: az I. régió tartalmazza a *nifA* és *nifB* géneket, a II. régió pedig a *nifHDK* operont, a *nifE*, *ORF4* és *fixX* géneket. A *glnA*, *ntrB* és *ntrC* gének egy operonban találhatóak, távolabb a *nif* régióktól. A *nifA* gén transzkripciója, eltérően az *Azospirillum*tól, σ^{54} - és NtrB/NtrC-függő (Souza és mtsai., 1991). A NifA fehérje aktivitása a baktérium nitrogén és oxigén ellátottságának függvénye. A fehérje aktiválásához, csakúgy, mint az *A. brasilense*-ben, a P_{II} fehérje szükséges (Pedrosa és mtsai., 1997). A P_{II} fehérje feltehetőleg itt is a sejt N-státuszának jelét továbbítja a NifA aktivátor fehérje felé,

ezen keresztül pedig a nitrogénáz struktúrgének megnyilvánulásának szabályozása felé (Benelli és mtsai., 1997).

A nitrogénkötés ebben a baktériumban is két szinten szabályozódik: a *nif* gének expressziójának szintjén és a nitrogénáz enzim aktivitásának szabályozása révén. Az enzimaktivitás szabályozás azonban eltérő. A baktérium genomában *draT/draG* génekkel szerkezetileg homológ DNS szekvenciákat nem találtak. Ammónia asszimilációs körülmények között sem a dinitrogénáz, sem a dinitrogénáz-reduktáz molekulán nincs kovalens módosítás. Feltételezhető, hogy az ammónia membránpotenciál-csökkenést okoz a sejtben, így közvetett úton az elektron áramlást csökkenti a nitrogénáz enzim felé, és így fejt ki gátló hatását a nitrogénkötésre (Fu és Burris, 1989).

3.3. Az *Azospirillum*–gazdanövény együttélés kialakulása. Az *Azospirillum* baktériumok a gabonafélékkel és pászitfűfélékkel alkotnak asszociatív szimbiózist. A baktérium a gyökérepidermiszt kolonizálja, egyes törzsek azonban a belső gyökérszövetek sejt közötti járataiban is megtelepsznek (Patriquin és mtsai., 1983). Az asszociatív kapcsolat kialakulása sok és még nagyrészt ismeretlen lépésen keresztül megy végbe, melynek során mind a baktériumban, mind a növényben morfológiai, fiziológiai változások történnek (Del Gallo és Fendrik, 1994), és génmegnyilvánulás szinten zajló események zajlanak le (Fallik és mtsai., 1994; Karpati és mtsai., 1999). A kolonizáció első lépése a baktérium kemotaktikus vándorlása a gyökérhez, majd ezt követi egy laza reverzibilis kapcsolódás (adszorpció), és ezután jön létre az erős,

irreverzibilis kötődés (lehorgonyzás) a gyökérfelszínhez (Michiels és mtsai., 1994).

A növény gyökérexudátumával csalogatja az *Azospirillum*-ot. A baktérium kemotaktikus mozgással, azaz a gyökérexudátum táplálóanyagainak növekvő koncentrációja mentén úszva, sikeresebben találja meg a gazdanövényt, és halmozódik fel annak rizoszférájában, így kompetitív előnyt nyerhet a gyökérekolonizációban. A búza gyökérexudátum alkotórészei közül az *Azospirillum*-ra leginkább vonzó hatással van a glutaminsav, a glicin, a galaktóz, a szukcinát és a malát. A glutaminsav, ha egyedüli C- és N-forrásként áll rendelkezésre, a baktérium növekedéséhez és nitrogénkötéséhez a legjobban hasznosuló táplálóanyag. A kukorica gyökérexudátumban nagy mennyiségben található almasav erősen csalogató hatású a kukorica gyökérről izolált *Azospirillum* törzsekre, míg a búza gyökérexudátumban lévő oxálsav a búzáról izolált törzsekre (Reinhold és mtsai., 1985).

Az asszociáció létrejöttében döntő lépés az *Azospirillum* gyökérfelszínhez kapcsolódása. Az *Azospirillum* fajok zöme főleg mint gyökérepidermisz kolonizáló ismert, de egyes fajok képesek behatolni is a gyökérbe. Így, az *A. brasilense* Sp7 a búzagyökér epidermiszén és a gyökérsapkán telepszik meg, míg az *A. brasilense* Cd, Sp254, SpBr14 sejtek főleg a gyökérsapkán és a gyökérbelsőben találhatók meg (Baldani és mtsai., 1986b; Bashan és Levanony, 1989a,b; Sukiman és New, 1990). Az *Azospirillum* fajok megtelepedési mintázata a gyökéren a növényfajtól is függ. Rizs, búza, paradicsom és szója gyökereken, az *A. brasilense* sejtek elsősorban a gyökér megnyúlási zónájához és a

mucigéles gyökérsapkához, és kisebb mértékben a gyökérszőrökhöz tapadnak (Bashan és mtsai., 1986; Bashan és Levanony, 1989a,b; Levanony és mtsai., 1989; Bashan és mtsai., 1991; Levanony és Bashan, 1991). Bashan és mtsai. (1989a) szerint ötször több baktérium telepszik meg a búzagyökér gyökérsapkán és megnyúlási zónában, mint a gyökérszőrökön. Egyes rizsfajták között is kolonizációs mintázatbeli különbségeket írtak le. Ugyanakkor, kölesben és kukoricában az *A. brasilense* gyökérszörzóna kolonizációja a döntő (Patriquin és mtsai., 1983). Del Gallo és mtsai. (1991) szerint rizs és búza csíranövények *A. brasilense* és *A. lipoferum* oltásakor a mucigéllal borított gyökérsapka vonzza legaktívabban a megtelepedő baktériumokat. A gyökérsapkától megfosztott gyökércsúcs kolonizálása jóval kisebb mértékű. Gyökérször kolonizációt csak szórványosan figyeltek meg.

Az *A. lipoferum* a búzagyökér epidermiszt lepi el (Baldani és mtsai., 1986b; Sukiman és New, 1990), míg a rizs gyökérször zónájában telepszik meg döntően (Murty és Ladha, 1987).

Számos szerző mutatott ki *A. brasilense* sejteket az endorizoszférában, gyökérkortex intercelluláris tereiben megtelepedve, kukoricában, búzában, rizsben, cirokban, pászitfűfélékben (Patriquin és Dobereiner, 1978; Schank és mtsai., 1979; Patriquin és mtsai., 1983; Whallon és mtsai., 1985; Baldani és mtsai., 1986b; Levanony és mtsai., 1989). Kukoricában és kölesben, a szállító edénnyalábokban lokalizáltak megtelepedett *Azospirillum* fajokat (Patriquin és Dobereiner, 1978; Tilak

és Subba Rao, 1987). 28 napos rizs és búza növényekben az *A. brasilense* Cd törzs a szárat is kolonizálta (Rethati és mtsai., 2000).

Azospirillum baktériumokat kizárólag csak elhalt növényi sejtek belsejében találtak (Lakshmi és mtsai., 1977; Umali-Garcia és mtsai., 1980). Bár a gyökérszőr zóna kolonizációját többen leírták egyes növényeknél, gyökérszőr sejtekbe behatolt *Azospirillum* baktériumot nem találtak. Feltételezik, hogy az *Azospirillum* nem a gyökérszőrökön keresztül lép be a gyökérbe.

Kimutatták, hogy mind az *A. brasilense*, mind az *A. lipoferum* sejtek pektinolitikus aktivitással bírnak, amely, a növényi sejt fal bontása révén, elősegítheti a baktérium bejutását a gyökérbe (Patriquin és Döbereiner, 1978; Umali-Garcia és mtsai., 1980).

Mindemellett, nagyszámú *Azospirillum* sejt hatol be a gyökerekbe az oldalgökök kitörési pontjainál keletkező repedéseken, a gyökérepidermiszen keletkező sebzéseken, réseken keresztül (Lakshmi és mtsai., 1977; James, 2000).

Az *Azospirillum* fajok gyökérekolonizációja nem gazdanövény specifikus. Az endorizoszférát kolonizáló törzsek gazdanövény szelektivitását azonban megfigyelték. A rizs és búza endorizoszférájából *A. brasilense*, a kukoricából *A. lipoferum* törzseket izoláltak (Baldani és Döbereiner, 1980; Baldani és mtsai., 1986b).

A gyökér és a baktérium közötti kapcsolat kialakulásában meghatározóak lehetnek a két érintkező sejt felszín alkotóelemei. Így a baktérium részéről az extracelluláris anyagok és függelékek, a

sejtkapszula és annak alkotórészei a kiemelten jelentősek: a kapszuláris- (CPS) és exopoliszacharidok (EPS), a sejtfelszíni lipopoliszacharid (LPS) réteg, a kapszula fehérjék, a poláris flagellum és a cellulóz fibrillumok. A növény részéről a gyökércsúcsot borító mucigéles sapkának, a gyökérfelszín fehérjéinek, glikoproteinjeinek, poliszacharidjainak, a gyökérlaktinoknak és a gyökérexudátum összetevőinek lehet szerepük (összefoglalva Del Gallo és Fendrik, 1994).

A baktérium sejtfelszín CPS rétege vastag, sűrű, a sejthez szorosan kötődő poliszacharid réteg, az EPS lazább szerkezetű és gyengén asszociálódik a sejtfelszínhez. A kalkofluort kötő sejtfelszíni poliszacharidok [$\beta(1\rightarrow4)$ - és $\beta(1\rightarrow3)$ -kapcsolt] az EPS és CPS frakciók között oszlanak meg (Del Gallo és mtsai., 1989). Az *A. brasilense* és az *A. lipoferum* EPS frakcióját nagyrészt glükóz, galaktóz, ramnóz, galakturonsav és szukcinilsav alkotja. N-acetil-glükózamint csak nyomokban, HPLC és NMR technikával tudtak kimutatni benne. Az EPS antigén hatású. Az *A. brasilense* Sp7 törzs EPS ellen termelt antitest nem ad keresztreakciót a Cd törzs termelte EPS-sel (Levanony és Bashan, 1989), ami a két törzs EPS frakcióinak specifikus cukor-összetételbeli különbségére utal. Az EPS frakcióban az egyes monoszacharidok aránya függ a tápközegben lévő szénforrás minőségétől, a tenyészet korától. Kalkofluor és kongóvörös festéssel kimutatták, hogy nitrogénkötő, vibroid *A. brasilense* sejtek nem termelnek EPS-t (Bastaracchea és mtsai., 1988; Yagoda-Shagam és mtsai., 1988).

Az *A. brasilense* LPS frakciója nem vesz részt a baktérium gyökérfelszínhez való kapcsolásában.

A. brasilense és *A. lipoferum* sejtek CPS rétegében kalkofluor-kötő poliszacharidokat mutattak ki, a kapszulájuktól megfosztott sejtek viszont nem mutattak kalkofluor festődést (Del Gallo és mtsai., 1989). *A. lipoferum* sejtek felszínén, cukorláncok terminális tagjaiként *N*-acetyl-D-glükózamin dimereket, $\alpha(2\rightarrow3)$ - és/vagy $\alpha(2\rightarrow6)$ -kapcsolt *N*-acetyl-neuraminsavat, *N*-acetyl-galaktózt és/vagy α -laktozil-, α -mannozil-, α -glükozil- cukorcsoportokat mutattak ki, melyek feltehetően a kapszularéteg alkotórészei. A sejtek kapszulájában búzacsíra agglutinint kötő receptorfehérjét azonosítottak (Karpati és mtsai., 1999).

Az *A. brasilense* és az *A. lipoferum* C-típusú, vastag kapszulával borított, nem mozgó, erősen fénytűrő, gömbölyű sejtek képzésére képes, melyekben PHB nagy mennyiségben halmozódik föl (Eskew és mtsai., 1977; Tarrand és mtsai., 1978; Sadasivan és Neyra, 1987). A sejtek nagy ellenálló képességet mutatnak kiszáradással és káros sugárzásokkal szemben, kialakulásuk támogatja a populáció fennmaradását kedvezőtlen fizikokémiai körülmények között. Glukonát vagy fruktóz tartalmú folyadéktenyészetben a C-típusú sejtek sok adhezív CPS-t termelnek, melynek sejtaggregáció és flokkuláció az eredménye (Sadasivan és Neyra, 1985). Kukorica és búza gyökéren is kimutattak baktérium csomókat, "flokkokat", melyeket flagella nélküli baktériumok alkotnak, és amiket cellulózfibrillumok rögzítenek egymáshoz (Del Gallo és mtsai., 1989).

Az *A. brasilense* búzagyökérhez kapcsolódása két szakaszra oszlik: az első az adszorpció (Ads), egy gyors és gyenge kötődés, amely az oltás után két órán belül megtörténik. A folyamatban a baktérium kapszuláris

fehérjéi és a poláris flagellum vesz részt. A második lépés a lehorgonyzás (anchoring = Anc), ami az oltás után 8 órával kezdődik és 16 óra múltával végződik. Ekkor a baktériumot cellulóz fibrillumok rögzítik erősen és irreverzibilisen a gyökérfelszínen (Croes és mtsai. 1993). A gyökérfelületen megtelepedéshez az adszorpció nem feltétlenül szükséges, amit Ads^+Anc^- és Ads^-Anc^+ mutánsokkal mutattak ki (Michiels és mtsai., 1991).

3.3.1. Az együttélés kialakulásának genetikai háttere (összefoglalva Vande Broek és Vanderleyden, 1995). Az asszociáció kialakításában és fenntartásában szerepet játszó *Azospirillum* gének felkutatását más baktériumfajokból származó, már ismert génekből készített heterológ DNS próbákkal kezdték. Az *A. brasilense* és az *A. lipoferum* genomjában szerkezetileg homológ DNS szakaszokat találtak a *Rhizobium meliloti nodABCDEFGHIJ* génekkel, melyek a Nod faktor bioszintézisben vesznek részt, valamint a *nodPQ* és *nodG* gazdaspecifikus nodulációs génekkel (Fogher és mtsai., 1985). Az *A. brasilense nodPQ* és *nodG* homológ DNS szakaszainak mutációja kiderítette, hogy ezek a gének feltehetőleg általános sejtháztartási funkciót látnak el, semmint a növény-baktérium kölcsönhatás résztvevői (Vieille és Elmerich, 1990).

Növényi szimbionta és patogén baktériumok felületi poliszacharidja gyakran esszenciális szerepet kapnak a növényvel való kapcsolatban. A sejtfelületi poliszacharidok bioszintézisében résztvevő *Azospirillum* gének kereséséhez kalkofluort nem kötő *A. brasilense* mutánsokat izoláltak és jellemeztek. A mutánsok a vad típusnak

megfelelő mennyiségben termeltek EPS-t, folyadéktenyészetben nem flokkuláltak, és jóval kisebb lehorgonyzási kapacitást mutattak búza gyökéren (Michiels és mtsai., 1990, 1991).

R. meliloti *exo* mutánsok *A. brasilense* génkönyvtárral végrehajtott genetikai komplementációjával további *exo* géneket azonosítottak. *A. brasilense*-ben *R. meliloti* *exoB*-szerű gént két működő kópiában is találtak, termékük az EPS, LPS és ciklikus glükán bioszintézisben működő UDP-glükóz-4-epimeráz (De Troch és mtsai., 1992). Mutáns hiányában e gének szerepe a növényvel kapcsolatban nem ismert.

Az *A. brasilense* *exoC*-szerű génhely strukturális, de nem funkcionális homológiát mutat a *R. meliloti* *exoC* génnel, amely egy, a szukcinoglükán szintézisben résztvevő fehérjét kódol. A *R. meliloti* *exoC* hibát kijavító *A. brasilense* DNS szakasz viszont nem vesz részt kalkofluor-kötő PS szintézisben. Az *A. brasilense* *exoC* mutáns a vad típusal megegyező mértékben kötődik a búzagyökérhez (Michiels és mtsai., 1988, 1991).

A talajbaktériumokban, a növényvel kölcsönhatásban résztvevő gének nagy részét megaplazmidok hordozzák. Az összes *Azospirillum* fajban megtalálható egy 90 MDa plazmid, a rizocönotikus plazmid (pRhico). A plazmid fizikai térképe ismert (Croes és mtsai., 1993). Kúrálása sikertelen volt, ami arra utal, hogy feltehetőleg nélkülözhetetlen sejtfunkciókat hordoz. Az *A. brasilense* pRhico *exoB* és *exoC* géneket, *Rhizobium nodP*- és *nodQ*-homológokat, mozgékonyágért (*mot*) és kemotaxisért felelős

géneket, flagella képzésben szereplő géneket hordoz (Michiels és mtsai., 1994). Fla⁻ plazmid deléciós mutáns gyökérhez kapcsolódását elemezve kiderítették, hogy a poláris flagellum részt vesz a baktérium gyökérhez tapadásának első fázisában, az adszorpcióban (Croes és mtsai., 1993).

3.3.2. A lektinek. A lektinek (Goldstein és mtsai., 1980) baktériumokban, gombákban, növényekben, állatokban széles körben előforduló fehérjék. Nem-immun jellegű molekulák, agglutinálják az állati vörösvérsejteket, ezért hemagglutinineknek is nevezik őket. Valamennyiük jellemzője, hogy képesek cukorcsoportokat, általában cukorláncok véghelyzetű tagjait, specifikusan felismerni, és így glikozilált molekulákhoz, poliszacharidokhoz, glikoproteinekhez specifikusan és reverzibilisen kötődni. A sejt felszínén található glikozilált makromolekulák és azok cukorláncjai, mint lehetséges lektinreceptorok, fontos jelemolekulák a sejt–sejt felismerésben (összefoglalva Kobata, 1992). A lektinek, hozzájuk kötődve, összekapcsolják ezeket a molekulákat a sejt felszínén, receptor aggregátumok képződnek, és ez a folyamat a sejtekben különféle biológiai válaszokat vált ki (Mandal és Brewer, 1993). A lektinek növekedés-szabályzók is lehetnek és hormonszerű hatást is kiválthatnak (Pusztai és mtsai., 1983).

A gyökérfelszínen lévő lektinek, lévén, hogy különbséget tudnak tenni a különféle baktériumok sejt felszínének egyedi cukormintázatai között, segíthetik a baktériumot a gazdanövény felismerésében és a gyökerén megtelepedésben. A hüvelyes növények gyökérlektinjei részt vesznek a gazdaspecifikus *Rhizobium* faj felismerésében és

megkötésében (Diaz és mtsai., 1989; Halverson és Stacey, 1986). Bablektint termelő transzgenikus lóherén sikeres szimbiózist hoztak létre a *R. leguminosarum bv viciae*-vel, a bab szimbiotájával, mely természetes körülmények között a lóherével nem képes szimbiózisba lépni (Diaz és mtsai., 1989). Ugyanígy, szójabab lektint termelő transzgenikus *Lotus corniculatus* növényt sikeresen nodulált a *Bradyrhizobium japonicum*, amely a szójabab szimbiotája és a *Lotus corniculatus*-on nem képez gümőt (van Rhijn és mtsai., 1998). *R. japonicum* sejtek CPS frakciójában szójabab agglutinint kötő alkotókat mutattak ki (Bohlool és Schmidt, 1976). A *R. trifolii* sejtfelszínén lektinkötésre képes sejtfal-poliszacharid antigéneket találtak, és kimutatták a *nod* gének részvételét ezek bioszintézisének szabályozásában (Dazzo és Truchet, 1983). Nemrégiben közölték, hogy a *Rhizobium* Nod faktorok is lektin molekulához kötődnek a lucerna, a borsó, a *Lotus japonicus* gyökérfelszínén. Ezek a lektinek enzimaktivitással rendelkeznek (apirázok), és feltehetőleg a gyökérléktinek egy különleges csoportját alkotják (Roberts és mtsai., 1999).

Az *A. brasilense* sejtek kölesgyökérhez kapcsolódásában egy, a mucigélben és a gyökérexudátumban lévő lektinszerű anyag (Umali-Garcia és mtsai., 1980), míg kukorica gyökérszőrökhöz kapcsolódásában egy tripszin szenzitív gyökérexudátum komponens vesz részt. Hővel előlt kukorica gyökerekhez a baktérium nem kapcsolódott (Gafny és mtsai., 1986). Bashan és mtsai. (1986) szerint élő és hővel előlt búza gyökereken azonos számú *A. brasilense* sejt telepedett meg.

Táptalajon tenyésztett *A. brasilense* baktériumok az alábbi lektineket kötötték, a kötési affinitás csökkenő sorrendjében: *Griffonia simplicifolia* I és II agglutinin, búzacsíra agglutinin, szója agglutinin, *Concanavalia ensiformis* agglutinin (Yagoda-Shagam és mtsai., 1988). Más szerzők szerint a szója agglutinin nem kötődik *A. brasilense* és *A. lipoferum* sejtekhez (Del Gallo és mtsai., 1989; Karpati és mtsai., 1999). A búzacsíra agglutinin kötődés mértéke függ a baktérium tenyészet korától. Az EPS és CPS rétegeitől megfosztott baktériumok nem kötöttek lektint (Del Gallo és mtsai., 1989).

3.3.2.1. A búza gyökérléktin, a búzacsíra agglutinin, és szerepe a búza és *Azospirillum* kölcsönhatásában. A búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin, WGA) (LeVin és mtsai., 1972) a gabonafélék szorosan rokon lektinjeinek (Wright és mtsai., 1991) legjobban ismert tagja. Jól meghatározott cukorkötő specifikussága miatt széles körben használják biológiai, biokémiai kutatásokban cukortartalmú molekulák elválasztására és azonosítására (Yoshida és mtsai., 1997), eukarióta sejtek felszíni szerkezetének és a sejt felszíni komponensek működésének leírására (Santer és mtsai., 1990). A WGA a búza csíranövény teljes felszínén, a kifejlett búzanövény gyökércsúcsain expresszálódik (Miskind és mtsai., 1983). Így specifikus kötőhelyként szolgálhat a gyökérfelszínen az *Azospirillum* sejtek sikeres megtapadásához.

A WGA két, 18 kDa alegységből felépülő homodimer fehérje molekula (Nagata és Burger, 1974). Az alegységek 4–4 homológ doménre oszlanak (6. ábra). A WGA kéttípusú *N*-acetilált cukrot köt specifikusan: véghelyzetű $\beta(1\rightarrow4)$ -kapcsolt *N*-acetil-D-glükózamin

dimereket ($\text{GlcNAc}_{\text{di}}$), valamint $\alpha(2\rightarrow3)$ - és $\alpha(2\rightarrow6)$ -kapcsolt véghelyzetű *N*-acetyl-neuraminsav (NeuNAc) csoportokat (Wright, 1980; Wright, 1984). A molekulán, az alegységek érintkezési felületein található a két elsődleges és a két másodlagos cukorkötő hely. Az elsődleges kötőhely $\text{GlcNAc}_{\text{di}}$ és NeuNAc csoportot is köthet (de sosem mindkettőt egyidejűleg), a másodlagos kötőhely csak $\text{GlcNAc}_{\text{di}}$ csoportokat ismer föl. Mindkét cukorkötőhely három alkötőhelyre oszlik.

6. ábra. A WGA molekula sematikus képe az elsődleges és másodlagos cukorkötő helyekkel. I, II, alegységek; A, B, C, D, domének az alegységen belül. Minden kötőhely három alkötőhelyre oszlik (kis körök) (Wright, 1980 alapján).

Mind az elsődleges, mind a másodlagos kötőhely tartalmaz 1,2,3 orientációjú alkötőhely-elrendeződés mintázatot, ami GlcNAc di/trimer végződésű cukor oldalláncot képes kötni. Az elsődleges kötőhely 1,-2,-3 alkötőhely-elrendeződés kombinációban is működik, és ez a mintázat

terminális NeuNAc csoportot hordozó cukorláncot köt (Allen és mtsai, 1973; Nagata és Burger, 1974). Mindkét kötőhelyen az 1-es alkötőhelyhez kapcsolódás a legerősebb és legspecifikusabb (Wright, 1984).

Az *Azospirillum* kötődése a WGA-hoz feltehetőleg fontos lépés a baktérium megtelepedésében a búza gyökérfelszínén, azonban alig ismerjük a baktérium és a lektin kölcsönhatását és az ebből eredő biológiai folyamatokat. A WGA kötődését *A. brasilense* és *A. lipoferum* sejtek felszínéhez fluoreszcens festékkel jelölt lektinnel, epifluoreszcens mikroszkópiával mutatták ki (Del Gallo és mtsai, 1989).

Az *A. brasilense* sejtek CPS és EPS frakcióiban olyan lipopoliszacharid–protein és poliszacharid–lipid komplexeket találtak, melyek GlcNAc tartalmúak, így elképzelhető, hogy képesek WGA kötésre (Skvortsov és Ignatov, 1998). WGA kezelésre nőtt az *A. brasilense* sejtek összes fehérje tartalma (Antonyuk és mtsai., 1997). Mind *A. brasilense*-ben, mind *A. lipoferum*-ban kimutatták, hogy a WGA kötődése a sejtekhez specifikusan növeli a baktérium nitrogénkötését (Antonyuk és mtsai., 1993; Karpati és mtsai, 1999). *A. lipoferum*-ban, a megnövekedett nitrogenáz enzim aktivitással párhuzamosan, az enzim bioszintézisében és annak szabályozásában részt vevő gének expressziójának növekedését is leírták. A baktérium kapszulájában WGA-kötő receptort azonosítottak (Karpati és mtsai, 1999). Eukarióta sejtekben már több WGA-kötő transzmembrán receptorfehérjét leírtak, melyek glikozilált proteinek. Így például az eritrocitákban a glikophorin–A fehérje, melyen GlcNAc monomereket hordozó

doméneket is azonosítottak, mint lehetséges kötődési felületeket a WGA számára (Wright és Jaeger, 1993).

A WGA sejthez kötődése sokrétű biológiai hatást vált ki. Élesztőben olyan, WGA kötődésre aktiválódó ATP-ázot azonosítottak, mely a sejtmembrán pórusain keresztül folyó nukleinsav transzportban vesz részt (Tsuchiya és mtsai., 1989). A WGA vérelemekhez kötődése egy jelátvitelben résztvevő fehérje foszforilálódását indukálja (Ganguly és mtsai., 1985). A WGA növekedésgátló hatást fejt ki a *Fusarium* fajokra, a gombasejtfal kitinjének GlcNAc alegységeihez való kötődés révén (Ciopraga és mtsai., 1999).

3.4. Nitrogénkötő asszociációk a gyakorlatban: növényoltások és hasznuk

Az elmúlt 20 évben számos *Azospirillum*-os növényoltást végeztek és változatosak a szakirodalomban olvasható eredmények és vélemények. Az oltás jótékony hatását gabonaféléknél és fűféléknél (búza, cirok, kukorica, köles, cukornád, árpa, Kallar-fű), napraforgónál és mustárnál, zöldségféléknél (paradicsom, édes paprika, spanyol paprika), hüvelyeseknél (csicseriborsó, lóhere, lucerna) (összefoglalva Fages, 1994) közzétették. Az oltás legnyilvánvalóbb hatása a gyökérrendszer fejlődésének serkentése, a gyökértömeg és az oldalgyökerek számának növekedése volt. Emellett zöldséggyarapodásról és termésnövekedésről is beszámoltak. A sikert egyes agronómiai paraméterek, a talaj nitrogéntartalma és szemcsemérete jelentősen befolyásolták.

Az oltás hatása főleg a növény korai fejlődési szakaszában nyilvánul meg, a gyökerek kolonizációját követő néhány héten belül (Okon és Labandera-Gonzales (1994). Ezért az oltóanyagot a vetést követő 2–3 hétben aktívan kell kolonizálnia a növényt. A búzában 10^5 – 10^6 sejt/növény (Kapulnik és mtsai., 1985), a kukoricában 10^7 sejt/növény (Arsac és mtsai., 1990), a rizsben 10^6 – 10^7 sejt/100 mg növény (Rethati és mtsai., 2000) tömegben megtelepedett oltóbaktérium jótékonyan befolyásolta a gazdanövény növekedését.

Termésnövekedés, gabonafélék szántóföldi oltásakor, a kísérletek 60–70 %-ában fordult elő, 5–30 %-os mértékben (összefoglalva Okon és Labandera, 1994; Okon és mtsai., 1995). Több szerző írja, hogy a baktérium által megkötött nitrogénnek csak kis hányada használandó föl a növény növekedéséhez (Okon és mtsai., 1983; Rao és mtsai., 1987). Ciroknál és kölesnél ezt mindössze 1 kg N/ha/év-re becsülték (Smith és mtsai., 1984), mások kukoricánál nem találtak többlet nitrogénbeépülést (O'Hara és mtsai., 1981). Más szerzők megnövekedett nitrogénbeépülést közöltek búzánál, de ezt inkább az *Azospirillum* aktív nitrát asszimilációjának tudták be (Boddey és mtsai., 1986).

A biológiailag kötött nitrogén növénybe épülése jelenleg legmegbízhatóbban az ^{15}N izotóphígításos és ^{15}N természetes előfordulás vizsgálatokkal mérhető. Mindkét módszerrel végzett kísérletek megerősítették, hogy a legnagyobb mennyiségű, levegőből kötött nitrogént a cukornád asszimilálja (Urquiaga és mtsai., 1992; Boddey és mtsai., 1995). A beépült nitrogén mennyisége azonban nagyon különböző, a növény genotípusától

és a környezeti tényezőktől függően. Brazil cukornádajták N-szükségletének 70 %-át biztosítja biológiai nitrogénkötés, mintegy 150 kg N/ha/év mennyiségben (Boddey és mtsai., 1995). Ezen fajták kiválogatódásához jelentősen hozzájárult, hogy Brazíliában közel 100 éve alig alkalmaznak nitrogén műtrágyázást a cukornádtermesztésben.

Rizsben, három rizsfajtát vizsgálva, Boddey és mtsai. (1995) nem talált légköri eredetű N beépülést. Mások, genotípustól függően, 0-20 % között becsülik a hozzájárulás mértékét a nitrogéntápláláshoz, főleg alacsony nitrogén műtrágya felhasználású területeken (Wu és mtsai., 1995; Shrestha és Ladha, 1996; Ladha és Reddy, 1995; Boddey és mtsai., 1995).

Búzában egyes szerzők szignifikáns nitrogénkötést és ebből eredő N-beépülést közölnek, míg más eredmények azt mutatják, hogy a biológiailag kötött nitrogén az elhalt baktériumok N-tartalmú szerves molekuláinak ásványosítása révén kerül beépítésre a búzában (Rennie és mtsai., 1983; Chalk, 1991; Bremer és mtsai., 1995).

A kukorica, fajtától függően, nitrogénszükségletének akár 50-60 %-át is nyerheti a biológiai nitrogénkötésből, ugyanakkor egyes fajták egyáltalán nem képesek a nitrogénkötő asszociációt értékesíteni (Garcia de Salamone és Dobereiner, 1996; Garcia de Salamone és mtsai., 1996).

*Azospirillum*mal oltott búzánál és ciroknál a megnövekedett gyökérszet következtében jobb szárazságtűrést is megfigyeltek (Sarig és

mtsai., 1988). A gyorsabb gyökérnövekedéshez nagyobb mértékű ásványi anyag felvétel is társult (Baldani és mtsai., 1983).

Az *Azospirillum* oltóanyagok nagy része vizes, ásványi- vagy szerves olajos baktérium szuszpenzió formájában készül (Okon és Labandera-Gonzales, 1994). Széles körben alkalmazott a Zea-Nit[®], amely *A. brasilense* Cd és *A. lipoferum* SpBr17 törzsek keveréke (1×10^9 sejt/ml oltóanyag).

Mivel az azospirillumok túlélése és kompetitív képessége a talajban szabadon élve rossz, ezért a baktériumok hordozóanyagon rögzítése, immobilizálása növelheti az oltás hatékonyságát. Emellett is szükséges azonban az évenkénti újraoltás. A rögzített sejtes oltóanyaggal szembeni elvárások:

- biztosítani kell a hatékony kolonizációhoz szükséges baktérium populációt a csírázás első napjaiban;
- védenie kell a baktériumot a talajba juttatott peszticidekkel szemben;
- támogatnia kell a baktérium sikeres túlélését legalább egy vegetációs perióduson keresztül;
- valamint agrotechnikailag könnyen kezelhetőnek, és gyártásának is olcsónak kell lennie.

Különbéle hordozóanyagokon rögzített *Azospirillum* oltóanyagok eredményeiről több közlemény szól. Gabonaféléknél tőzeg- (Okon és Hadar, 1987) és alginát- (Berge és mtsai., 1990) alapú mikrogranulátum oltóanyagokkal értek el pozitív hatást. Franciaországban, kukoricában széles körben használják az AZOGREEN[®] tőzeg alapú mikrogranulátum oltóanyagot (*A. lipoferum* CRT1 törzs, 5×10^6 sejt/g oltóanyag), mellyel

10–20 % termésnövekedés érhető el. Az oltóanyagot a csírázási erély javítására, a gyökérzet növelésére, a szárazságtűrés fokozására és a növény általános egészségi állapotának javítására is javasolják (Fages, 1994). Olaszországban a Zea-Nit[®] oltóanyag vermikulit hordozón rögzített formáját is használják. Kukorica kísérletekben a nitrogén műtrágya 35–40 %-át helyettesítette anélkül, hogy a termés csökkent volna. Floridában, tőzegen rögzített *A. brasilense* Cd inokulummal a cirokban 11–24 % termésnövekedést tapasztaltak. Indiában a cirok *A. brasilense* oltásával, különböző agroklímikus viszonyok között, átlagosan 19 % termésnövekedést értek el. A köles 20–30 % termésnövekedést adott a kísérletek 60 %-ában. Izraelben, tőzeg alapú *A. brasilense* inokulummal (1×10^7 sejt/mag vagy növény), a cirok, a köles és a *Setaria italica* 15–20 % termésnövekedést adott. Kukoricánál 20–30 %-kal nőtt a termés az oltások 70 %-ában (összefoglalva Okon és Labandera-Gonzales, 1994).

Térhálós szerkezetű biopolimer hordozón, az alginátgyöngyön rögzített oltóanyagok, mint "sejtraktárok" működnek, védik és a hordozóanyag lebomlásának ütemében szolgáltatják az élő sejteket a talajban. Az *A. brasilense* alginát gyöngybe foglalása elősegítette a sejtek C–formába alakulását (Uckert és mtsai., 1990). Alginátgyöngyre rögzített *A. brasilense* és *Bacillus circulans* kevert oltóanyag kukoricában bizonyult hatékonynak (Berge és mtsai., 1990). Az oltóanyag elterjedését azonban gátolja bonyolult és drága előállítási technológiája. Ezzel szemben a cellulózgyöngyön rögzítés technológiailag egyszerű és olcsó folyamat. Cellulózgyöngyön rögzített *A. brasilense* és *H. seropedicae*

oltóanyag rizsben és búzában jelentős növekedésserkentést adott, tenyészedényes kísérletekben (Rethati és mtsai., 2000).

Az oltóanyag magon rögzítésére is közöltek eredményeket (Stein és mtsai., 1995). Kallar fű (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) magját borító alginát rétegben rögzítettek *A. brasilense* és *H. seropedicae* baktériumokat. Ez utóbbi a Kallar fű természetes endoszimbiontája. Monoaxenikus, egyedi oltásnál, mindkét baktérium esetén a rögzített forma hatékonyabb volt a folyadék tenyészetnél, a magvak beburkolása elősegítette a gyökerek kolonizációját. A baktériumok hasonló mértékben telepedtek meg a növényben (*A. brasilense* $1,9 \times 10^8$ sejt/g gyökér; *H. seropedicae* $1,4 \times 10^8$ sejt/g gyökér). Kevert oltásnál a *H. seropedicae* erőteljes kolonizációja mellett visszaszorult az *A. brasilense* megtelepedése a növényben, még akkor is, amikor *A. brasilense*-algináttal fedett magokat a *H. seropedicae* folyadék oltóanyagával oltották. Látható tehát, hogy rögzített sejtes oltóanyagforma alkalmazásánál is pontosan fel kell mérni az oltótörzsek kompetitív erőviszonyait.

Belimov és mtsai. (1995) *A. lipoferum*, *Arthrobacter mysorem*, *Agrobacterium radiobacter* és *Flavobacterium* törzsek egyedi oltását vizsgálták árpán, búzán, rizsen, zabon, rozson, repcén, káposztán, paradicsomon és lucernán. Az *Arthrobacter* és az *Agrobacterium* kolonizációs képessége minden növényen meghaladta a másik két baktérium fajét. A növény genotípus befolyásolta a növénybelsőben élő oltóbaktériumok számát, de a rizoplánban megtelepedőket nem. Az inokuláció jótékony hatása csak eseti volt és nem találtak összefüggést a

növényben élő baktérium populáció sűrűsége és a növény válasza között. Árpa és búza gyökerén a megtelepedő baktériumpopuláció nagysága és az oltás jótékony hatása összességében kedvezőtlen talajnedvesség tartalom, pH és talajhőmérséklet mellett volt a legkifejezettebb.

4. Anyagok és Módszerek

4.1. Molekuláris biológiai munkákhoz

Baktérium törzsek, plazmidok. Az *A. lipoferum* SpBr17R az SpBr17 vad típusú törzs (Tarrand és mtsai., 1978) rifampin-rezisztens spontán mutánsa. A WGA-t nem kötő (WGA⁻) törzs SpBr17R::Tn2706 (Rif^r, Cm^r) transzpozon inszerciós mutáns. Az *A. brasilense* Sp7 (Tarrand és mtsai., 1978), az *Azotobacter vinelandii* UW136 (Dingler és mtsai., 1988) és a *Klebsiella pneumoniae* UNF122 (Holtel és Merrick, 1988) vad típusú törzsek. A pAW1142::Tn2706 plazmid (Cm^r, Tc^r) (Olasz és mtsai., 1993) transzpozon donor volt az SpBr17R törzs mutagenéziséhez. A pRK2013 plazmid helperként szolgált a konjugatív transzpozon bevitelhez (Figurski és Helinski, 1979). A pAB358 (*nifH-lacZ*, Tc^r, Km^r), pAB576 (*nifA-lacZ*, Tc^r, Km^r) (Liang és mtsai., 1991), pAB904 (*glnB-lacZ*, Tc^r) és a pAB912 (*glnA-lacZ*, Tc^r) (de Zamaroczy és mtsai., 1993) plazmidok az *A. brasilense* promoter-*lacZ* transzkripció fúzióit hordozzák. A pAB53 (Tc^r) (Liang és mtsai., 1991) és a pAB914 (Tc^r) (de Zamaroczy és mtsai., 1993) sorrendben az *A. brasilense* *nifA* és *glnB* génjeit hordozzák.

Táptalajok és tenyésztési körülmények. Az *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *Escherichia coli*, *A. vinelandii* és *K. pneumoniae* törzseket Luria-Bertani komplett táptalajban (Sambrook és mtsai., 1989) tenyésztettük. Minimál táptalaj az *A. lipoferum* és az *A. brasilense* törzsek tenyésztéséhez: 29,0 mmol KH₂PO₄, 26,0 mmol K₂HPO₄, 37,0 mmol almasav, 75,0 mmol NaOH, 20,0 mmol NH₄Cl, 1,7 mmol NaCl,

0,81 mmol MgSO₄, 0,13 mmol CaCl₂, 0,01 mmol MnSO₄, 0,02 mmol Fe₂SO₄, 0,02 mmol Na₂EDTA, 0,004 mmol Na₂MoO₄ és 4,0 mmol biotin) (Okon és mtsai., 1976). A nitrogénmentes minimál táptalaj nem tartalmaz NH₄Cl-ot. Az *A. vinelandii* és a *K. pneumoniae* tenyésztéséhez a nitrogénmentes táptalajok Dingler és mtsai. (1988), valamint Holtel és Merrick (1988) szerint készültek. A baktérium tenyészetek sejtszámát a tenyészetekből készített hígítási sorozatok antibiotikum tartalmú táptalajra szélesztésével, a telepkepző egységek számlálásával határoztuk meg és sejt/ml egységben fejeztük ki. A kloramfenikol, tetraciklin, rifampicin és kanamicin antibiotikumokat sorrendben 10, 20, 20 és 50 µg/ml táptalaj koncentrációban használtuk. Valamennyi törzset folyamatos levegőztetés mellett 30°C-on tenyésztettük.

Tn2706 random transzpozíciós mutagenézis és mutáns szelekció. Az *A. lipoferum* SpBr17R törzsbe a pAW1142::Tn2706 plazmidot háromszülős keresztezéssel vittük be pRK2013 helper plazmid segítségével. A transzpozont hordozó transzkonjugánsokat a Tn2706 Cm rezisztenciája alapján Rif és Cm tartalmú táptalajon szelektáltuk. A Tn2706 mutagenizált SpBr17R transzkonjugáns populációban WGA-t nem kötő mutáns sejteket kerestünk úgy, hogy a sejtek fluoreszcens festékekkel jelölt WGA (FITC-WGA) kötését teszteltük ultraibolya fényben. A WGA-t nem kötő (WGA⁻) törzs fluoreszcenciát nem mutató fenotípusát epifluoreszcens mikroszkópiával erősítettük meg.

Egyéb molekuláris technikák. A plazmid és genomiális DNS preparálást, az agaróz gél elektroforézist, a restrikciós endonukleáz

emésztést, a DNS–DNS hibridizálást (Sambrook és mtsai., 1989) szerint végeztük.

Differenciális lektinkötési vizsgálat. A baktériumok sejtfelszínén a lektinek megkötődését FITC-vel jelölt lektinokkal teszteltük (Sigma). Három napos, minimál táptalajon növesztett sejteket foszfáttal pufferolt sóoldatban (phosphate-buffered saline, PBS) szuszpendáltunk. A sejtuszuspenziókhöz a lektinokat $40 \mu\text{g}/10^8$ sejt/ml koncentrációban adtuk, majd a sejteket 30°C -on, 1 órán át inkubáltuk és mostuk. A lektinkötés mértékét az 525 nm hullámhosszon mért átlagos epifluoreszcenciával ($E_{525}/10^7$ sejt/ml) számszerűsítettük (Perkin-Elmer MPF 44B fluoriméter). A WGA–Neu és a WGA–Glc lektinokat úgy nyertük, hogy a WGA-t moláris fölöslegben adott NeuNAc-val vagy GlcNAc-val szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk, majd a nem kötődött ligandumot Sephadex G–25 gélen, molekulaszűréssel távolítottuk el.

WGA-t kötő komponensek kimutatása a sejtkapszulában. Három napos, minimál táptalajon növesztett sejteket 20 mmol HEPES, 1% Triton X–100 (pH 7,0) oldatban, 4°C -on, 18 órán keresztül rázattunk, proteáz inhibitorok jelenlétében (Protease Inhibitors Set, Boehringer utasításai szerint). A kapszulamentes sejteket 8000 rpm fordulatszámon, 4°C -on, 20 percig végzett centrifugálással leüleptítettük. A felülúszó frakciót Microcon–10 centrifugális szűrőn (molekulasúly elválasztási határ 10 kDa) (Amicon) töményítettük, majd meghatároztuk az oldat fehérjetartalmát (Lowry és mtsai., 1951). A fehérjéket nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS–PAGE),

denaturáló körülmények között, 10,0 % SDS–poliakrilamid gélben (monomer törzsoldat 30,8 % T, 2,7 % C) választottuk szét Laemmli (1970) leírása szerint, Hoefer Mighty Small II SE 250 elektroforézis készüléssel. A géleket Coomassie brilliant blue R–250 festéssel festettük. A fehérjemintázatokban a glikozilált polipeptidek kimutatására a géleket Schiff eljárással (SIGMA) festettük, a gyártó utasításai szerint. A glikoproteineket, aldehiddé oxidált cukorcsoportjaik színreakciójával hívtuk elő. A fehérjemintázatokat a gélekből nitrocellulóz membránra (Hybond) félszáraz blottolási technikával (Hoefer TE 70 SemiPhor készülék) vittük át. Hogy kimutassuk a mintázatokban a WGA-t kötő fehérjét, a membránokat digoxigenin (DIG)-konjugált WGA-val hívtuk elő (DIG Glycan Differentiation Kit, Boehringer), a gyártó utasításai szerint.

WGA-t kötő komponensek izolálása a sejt kapszulából WGA–affinitás kromatográfiával. A kapszuláris frakciót úgy készítettük, mint előbb. Az elválasztáshoz agarózhoz kötött WGA mátrixot (Vector Laboratories, USA) használtunk. A WGA–agaróz mátrixból oszlopot készítettünk a gyártó utasításainak megfelelően. Az oldott kapszulafrakciót az oszlopra vittük, majd az oszlopot mostuk 10 mmol HEPES, 150 mmol NaCl, 0,1 mmol CaCl₂ (pH 7,5) oldattal. A megkötődött anyagot 500 mmol *N*-acetil-D-glukózamin, 10 mmol HEPES, 150 mmol NaCl (pH 3,0) oldattal eluáltuk. Mind az áttörő, mind az eluált frakciók fehérjét 10,0 % SDS-poliakrilamid gélben, denaturáló körülmények között (Laemmli, 1970) választottuk szét és a géleket Coomassie brilliant blue R-250 festéssel festettük.

Nitrogenáz aktivitás mérés lektinek jelenlétében. Az *A. lipoferum* és *A. brasilense* tenyészeteket 16 órán át szaporítottuk minimál táptalajban. A tenyészeteket nitrogénmentes minimál táptalajban mostuk, reszuszpendáltuk, majd 2 óra nitrogenáz enzim derepresszióknak vetettük őket alá 30°C-on és 99,5:0,5 (vol/vol) N₂-O₂ atmoszférában. Ezután adtuk a tenyészetekhez légmentesen a lektineket (1 µg/10⁷ sejt/ml) és az acetilén gázt [10 % (vol/vol)], majd további 4 órán keresztül (vagy a kinetikai vizsgálatoknak megfelelő időtartamokig) folytattuk az enzim derepressziót. A nitrogenáz enzim aktivitást az enzim által az acetilénből redukált etilén mennyiségének gázkromatográfiás mérésével határoztuk meg (Burris, 1972) és nmol C₂H₄/10⁷ sejt/ml egységben fejeztük ki.

Az *A. brasilense nifH-lacZ*, *nifA-lacZ*, *glnBA-lacZ* és *glnA-lacZ* fúziók bevitele *A. lipoferumba* és β-galaktozidáz vizsgálat lektin stimulus jelenlétében. A pAB358, pAB576, pAB904 és pAB912 plazmidokat konjugációval vittük *E. coli* S17.1 törzsből a vad típusú *A. lipoferum* és a WGA⁻ mutáns törzsekbe (Simon és mtsai., 1983). A transzkonjugánsokat minimál táptalajon szelektáltuk a megfelelő antibiotikumok jelenlétében. A nitrogenáz enzimet a fentiek szerint derepresszáltuk és a β-galaktozidáz aktivitást 4 órával a lektinek hozzáadása után mértük SDS-kloroform segítségével permeabilizált sejtekből Miller (1972) leírása szerint.

Mind a nitrogenáz, mind a β-galaktozidáz vizsgálatokat három független kísérlet két párhuzamos tenyészetéből végeztük.

4.2. Növénykísérletekhez

Baktérium törzsek, növényfajták, táptalajok és tenyésztési körülmények. Az *A. brasilense* CdR és a *H. seropedicae* Z67R törzsek a Cd és Z67 vad típusú szülő törzsek (Tarrand és mtsai., 1978; Dobereiner és mtsai., 1993) rifampin-rezisztens mutánsai. A mutáns törzsek nitrogénkötő kapacitása, kolonizációs kapacitása rizsben, valamint a sejtek felületi cukorkomponensei (differenciális lektinkötési vizsgálattal, Karpati és mtsai., 1999) megegyeznek a vad típusú szülőkével (nem közölt adatok). A növényoltási kísérletekben használt teszt növények Karmina, Sandora és Ringola rizsfajták (*Oryza sativa* L.) (Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas), valamint Mv-23 búzafajta (*Triticum vulgare* L.) (SZIE, Tangazdaság) voltak.

A baktériumtenyésztést minimál táptalajban, illetve nitrogénmentes minimál táptalajban végeztük (Okon és mtsai., 1976). A rifampicin antibiotikumot 20 µg/ml táptalaj koncentrációban használtuk szelekcióra. A baktérium tenyészetek sejtszámát a tenyészetekből készített hígítási sorozatok antibiotikum tartalmú táptalajra szélesztésével, a telepkepző egységek számlálásával határoztuk meg és sejt/ml táptalaj egységben fejeztük ki.

Folyadék és rögzített sejt oltóanyagok készítése. A folyadék oltóanyag készítéséhez 100 ml minimál táptalajt stacioner fázisú baktérium tenyészettel oltottunk be úgy, hogy a tenyészet kezdeti sejtkoncentrációja elérje 10^7 sejt/ml értéket. A tenyészeteket folyamatos levegőztetés mellett, 16 órán át, 30°C-on tenyésztettük. A sejteket

nitrogénmentes minimál táptalajban mostuk. A tenyészeteket, megfelelő hígításban, a növényoltásokhoz használtuk.

A rögzített sejtes oltóanyagok vivőanyaga Mavicell-N[®] preformált cellulózgyöngy volt (2–4 mm átmérőjű, 8–10 m²/g fajlagos felületű) (Zoltek Co., Nyergesújfalu). 100 ml minimál táptalajt, mely 250 cellulózgyöngyöt tartalmazott, a fentiek szerint beoltottunk. A tenyészeteket folyamatos levegőztetés mellett, 30°C-on 7 napon keresztül inkubáltuk. A táptalajt minden 48 órában cseréltük. A 7 nap leteltével a cellulózgyöngyöket vagy friss minimál táptalajban reszuszpendáltuk a lombiktenyészet kísérletekhez, vagy nitrogénmentes minimál táptalajban mostuk és reszuszpendáltuk a növényoltásokhoz.

Lombiktenyészet vizsgálat. 100 ml minimál táptalajt oltottunk 7,0 g rögzített sejtes oltóanyaggal és a tenyészetet, folyamatos levegőztetés mellett, 30°C-on 50 napig inkubáltuk. A táptalajt minden 48 órában cseréltük. Az oltás után 2, 30 és 50 nappal meghatároztuk az oltóanyag sejtermelő kapacitását, azaz a cellulózgyöngyökből a táptalajba kirajzó baktériumok mennyiségét, amit a táptalaj egységnyi térfogatában lévő telepképző egységek számával adtunk meg (sejt/ml tápfolyadék). A sejtek nitrogénkötő kapacitását a nitrogénáz enzim aktivitásának mérésével állapítottuk meg.

Nitrogénáz enzim aktivitás meghatározás. A tenyészeteket nitrogénmentes minimál táptalajban mostuk és reszuszpendáltuk, majd 2 óra nitrogénáz enzim derepresszióknak vetettük őket alá 30°C-on és 99,5:0,5 (vol/vol) N₂–O₂ atmoszférában. Ezután a tenyészetekhez légmentesen 10 % (vol/vol) acetilén gázt adtunk, majd további 14 órán

keresztül folytattuk az inkubálást. A nitrogénáz enzim aktivitást, az enzim által katalizált acetilén redukció alapján, az acetilén/etilén mennyiségének gázkromatográfiás mérésével határoztuk meg és $\text{nmol C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt/ml egységben fejeztük ki (Burris, 1972). A növényben élő baktériumok nitrogénkötését a növényminták hasonló előkészítése után mértük.

Növényoltási kísérletek tenyészedényben. A magok felületi fertőtlenítését higanyklorid, etanol kezeléssel és Na-hipoklorit utósterilizációval végeztük. A fertőtlenítés hatékonyságát a magok LB, minimál és vizes agar táptalajon, 30°C-on, 72 órás inkubálásával ellenőriztük. A felületileg fertőtlenített magokból vizes agar táptalajon nevelt, 3 napos csíranövényeket mosott és hőkezelt homokba ültettük (5 növény/edény). A homokot, ezt megelőzően, 5 ml folyadék vagy 5, 10, 20 és 30 gyöngynyi rögzített sejtes oltóanyaggal oltottuk be. A növényeket 20–25 °C hőmérsékletű növényházban, napi 16 órás megvilágítás mellett, 28 napig neveltük. A növényeket szükség szerint öntöztük. 28 nap eltelte után a gyökereket a szákról levágtuk, mindkettőt légszárazra szárítottuk és mértük. A gyökereket 16 órán át 10 mmol kálium-foszfát, 0,1 % Triton X-100 (pH 7,0) pufferben rázattuk, szobahőmérsékleten. A felülúszóból megadtuk a gyökérfelszínen lazán megtelepedett baktériumok számát (sejt/100 mg gyökér) (1. frakció). Azután mind a gyökereket, mind a szákat steril kvarchomokkal eldörzsöltük, reszuszpendáltuk 10 mmol kálium-foszfát (pH 7,0) pufferben, és a szuszpenzióból meghatároztuk a gyökérfelszínhez szorosan kapcsolódó és a gyökér belső szöveteiben megtelepedett

baktériumok együttes mennyiségét (sejt/100 mg gyökér) (2. frakció), valamint a szárban megtelepedett baktériumok számát (sejt/100 mg szár) (3. frakció). A növény gyökérzetével közrefogott, a gyökérzet közvetlen környékének talaját (rizoszféra talaj) légszárítottuk, és ebben is meghatároztuk az oltóbaktériumok számát (sejt/g rizoszféra talaj) (Tarrand és mtsai., 1978; Patriquin és mtsai., 1983; Boddey, 1987).

Az oltóbaktérium növényből, talajból való visszaizolálásához, a baktérium antibiotikum rezisztenciájának megfelelően, rifampicin tartalmú táptalajt használtunk. A táptalajt, ha szükséges volt, nisztatin antibiotikummal is kiegészítettük, a penészgomba szennyezések visszaszorítására. A nisztatin kiegészítés nem befolyásolta az oltóbaktérium visszaizolálási hatékonyságát (nem közölt adatok). Az oltóbaktériumok megkülönböztetését az esetleges szennyező baktériumoktól a szelektív táptalaj alkalmazásával, az oltóbaktérium törzsek jellegzetes telep fenotípusa, nitrogénkötési képességük és nitrogénmentes lágyagarban mutatott növekedési mintázatuk alapján végeztük. Egyféle, nem azonosított szennyező baktérium jelent meg, mely apró, sárga telepeket alkotott a szelektív táptalajon. A telepek, fenotípusuk alapján egyértelműen megkülönböztethetők voltak az oltóbaktériumtól. A telepek száma körülbelül egytizede volt az oltóbaktérium telepszámának. Valamint a szennyezőbaktérium nem volt képes nitrogént kötni. Ezenkívül, minden kísérletben nem oltott növényeket is neveltünk, belőlük oltóbaktériumot kimutatni egy esetben sem tudtunk.

Az oltási kísérletek értékelésénél az oltott növények növekedését mindig a nem oltott növényekéhez hasonlítottuk, ha másképpen nem definiáltuk.

Növényoltási vizsgálatok kémcsőben, mesterséges táptalajon.

3 napos csíranövényeket Gibson táptalajból készült ferde agarra ültettünk kémcsőben. A növénykéket 1-1 ml, megfelelő hígítású folyadék tenyésztettel oltottuk. A kémcsövekbe 1-1 ml Gibson táptalajt is mértünk. A növényeket 28 napig növényházban neveltük, a fent leírt körülmények között.

Rövidítések a molekuláris biológiai fejezethez

Rif ^r	rifampin rezisztens fenotípus
Tc ^r	tetraciklin rezisztens fenotípus
Cm ^r	kloramfenikol rezisztens fenotípus
Tc ^s	tetraciklin szenzitív fenotípus
WGA	búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin)
FITC	fluoreszcein izotiocianát
FITC–WGA	fluoreszcein izotiocianáttal jelölt búzacsíra agglutinin
WGA–Neu	búzacsíra agglutinin, melynek az elsődleges cukorkötőhelye <i>N</i> -acetil-neuraminsavval telített
WGA–Glc	búzacsíra agglutinin, melynek az elsődleges és másodlagos cukorkötőhelyei <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glükózaminnal telítettek
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin
GMA	<i>Glycine max</i> agglutinin
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin
UEAI	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin
NeuNAc	<i>N</i> -acetil-neuraminsav
GlcNAc	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glükózamin
DIG	digoxigenin
SDS–PAGE	nátrium-dodecilszulfát–poliakrilamid gél elektroforézis

5. Eredmények

5.1. Az *Azospirillum lipoferum* kölcsönhatása a búza gyökérlektinnel, a búzacsíra agglutininnel (WGA) a nitrogénkötő asszociáció kialakulása során

Dolgozatom első részében az *Azospirillum* és búza együttélés kialakulása során, a búza gyökérfelszín és a baktérium sejtfelszín közötti kölcsönhatást vizsgálom.

Bemutatom (1) a gyökérfelszínen expresszálandó lektin, a búzacsíra agglutinin és a baktérium sejtfelszín közötti felismerési folyamatot, (2) a lektin baktériumhoz kötődésének hatását a baktérium nitrogénkötésére, (3) a lektinkötődés kiváltotta jel kapcsolatát a nitrogénkötés szabályozási rendszerével a baktériumban. Végül pedig lektinkötő receptort keresünk a baktérium sejtfelszínén (4).

5.1.1. Az *A. lipoferum* SpBr17R törzs random transzpozon mutagenézise. Tn2706 transzpozont hordozó pAW1142 plazmidot helper plazmiddal segített konjugációval vittünk át a donor *E. coli* HB101(pAW1142::Tn2706) (Tc^r, Cm^r) törzsből a recipiens *A. lipoferum* SpBr17R (Rif^r) törzsbe. Rif^r, Cm^r, Tc^s fenotípusú transzkonjugánsokat 10⁻⁴ gyakorisággal, míg Rif^r, Cm^r, Tc^r fenotípusúakat 10⁻⁶ gyakorisággal kaptunk, a recipiens szülőre számítva. Mindkét típusból származó, nagyszámú, független transzkonjugánsból plazmid frakciót preparáltunk. A preparátumokat agaróz gél elektroforézissel elemezve, és pAW1142 próba DNS-sel hibridizálva kimutattuk, hogy a transzpozont szállító plazmid önálló replikonként nem marad fenn a sejtekben. A

transzkonjugánsok genom DNS-einek *EcoRI* és *BamHI* restrikciós endonukleázokkal emésztett és agaróz gél elektroforézissel szétválasztott mintázatait Tn2706 és pAW1142 DNS próbákkal hibridizáltuk. Kimutattuk, hogy a transzkonjugánsoknak több mint 80 %-ában a transzpozíció lejátszódott. A független transzkonjugánsokban a beékelődés a genom DNS egyetlen, de véletlenszerű pontjára, azaz annak különböző méretű fragmentjeibe történt. A beékelődött struktúrák változatosak voltak, kimutattunk csak transzpozon beépülést, de a transzpozonból és a vektor plazmidból összeépült különféle kointegrátumok inszercióit is. Mivel a dolgozat témája nem a transzpozíciós mechanizmus elemzése az *A. lipoférumban*, ezért ezeket az eredményeket nem részletezem.

Az eredmények megmutatták, hogy (1) a transzpozon–vektor plazmid öngyilkos rendszerként működik az SpBr17R törzsben, (2) a transzpozíciós gyakoriság elfogadhatóan magas egy hatékony mutagenézishoz, (3) a transzpozon beékelődés véletlenszerűen játszódik le, a recipiens sejt genom DNS-ének egyetlen, bár tetszőleges pontjára.

Mindezen feltételek teljesülése azért elengedhetetlen, mert így biztosítható, hogy egy mutagenizált SpBr17R populáció elég nagy számú és független mutáns sejtet tartalmazzon, amelyek közül a kívánt mutáns fenotípus már megfelelő gyakorisággal szelektálható.

5.1.2. WGA-t nem kötő (WGA⁻) mutáns törzs izolálása és jellemzése. Tn2706 mutagenizált SpBr17R transzkonjugáns populációban a sejtek WGA kötését teszteltük ultraibolya fényben, fluoreszcens festékekkel jelölt WGA-t (FITC–WGA) használva. A

fluoreszcenciát nem mutató, azaz WGA-t nem kötő fenotípusú (WGA^-) mutáns törzset közel 15 ezer független transzkonjugáns sejt átvizsgálásával nyertük. A vad típusú és a mutáns törzsek FITC–WGA-val festett preparátumait a 7. ábrán mutatjuk be. A vad típusú, FITC–WGA-t kötő sejtek ultraibolya fényben zölden fluoreszkáltak. Megfigyelhetjük, hogy a fluoreszcencia döntően a sejt kapszulákban volt látható, annak eloszlása ott egyenletes volt, nem mutatott polaritást a sejt pólusok felé. A vad típusú sejt populációnak több mint 96 %-a jól festődött. Ezzel ellentétben, a WGA^- törzs FITC–WGA festéssel sötét fenotípust mutatott. A sejt populációnak csak kevesebb, mint 1 %-a adott gyenge fluoreszcenciát.

7. ábra. A WGA kötődése az *A. lipoferum* sejtekhez. FITC–WGA-val festett vad típusú (A) és WGA^- (B) sejtek, epifluoreszcens mikroszkóppal (kb. 3×10^2 sejt, mindkét képen).

Jellemeztük továbbá a mutáns törzs kalkofluor festődését, azaz kalkofluor-kötő poliszacharidok jelenlétét a sejtfelszínen. A sejtek vad típusú festődést mutattak, ami ép $\beta(1\rightarrow3)$ - és $\beta(1\rightarrow4)$ -kapcsolt glükánok (Wood és Fulcher, 1978) meglétére utal (nem közölt adatok).

A mutáns törzsben a hibás DNS szakaszt a Tn2706 inszerció kimutatásával azonosítottuk. A genom DNS-t *EcoRI* és *BamHI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük, a DNS fragmenteket agaróz géll elektroforézissel szétválasztottuk. A fragment mintázatokat, nitrocellulóz membránra átvive, Tn2706 és pAW1142 próba DNS-ekkel hibridizáltuk. A hibridizációs mintázatok alapján megállapítottuk, hogy a genom DNS-en egy inszerció található. Az inszerció egy 5,1 kb *EcoRI* fragmentben, valamint egy ezzel átfedő 7,1 kb *BamHI* fragmentben helyezkedik el (8. ábra). A fragment klónozása és génkönyvtárból azonosítása folyamatban van.

Az inszerció mérete 14,0 kb. Az inszerció, mindkét szélén, egy-egy Tn2706 kópiát hordoz, melyeket egy, feltehetőleg delécióval megrövidült (Δ 0,8 kb) vektor plazmid DNS köt össze. Hasonló, több transzpozont hordozó plazmid kointegrátumokat, mint önálló replikonokat, a mutagenézisnél donorként használt *E. coli* törzs plazmid populációjában is találtunk (nem közölt adatok). Ezért föltételezhető, hogy a WGA⁻ törzsben talált inszerció is egy hasonló plazmid kointegrátum beékelődésének a következménye.

8. ábra. A Tn2706 inszerció lokalizálása a WGA⁻ mutáns törzsben. A felső vonal mutatja az inszerció helyét a genom DNS-en. Az alsó rész a beékelődött kointegrátumot ábrázolja a két Tn2706 kópiával, melyeket a pAW1142 plazmid egy 0,8 kb, nem definiált delécióval megrövidült származéka köt össze. *EcoRI* (E), *BamHI* (B) restrikciós endonukleáz vágási helyek.

5.1.3. A WGA kötődés hatása a baktérium nitrogénkötésére. A kísérletet *in vitro* körülmények között végeztük, azaz nem búzagyökéren élő, hanem mesterséges táptalajon nevelt baktériumokkal. A vad típusú és a mutáns sejtekhez tisztított WGA-t adtunk és vizsgáltuk a lektinkötődés hatását a baktériumok nitrogénkötésére. A tenyészetek nitrogénkötését 0,5 % oxigénkoncentráció mellett mértük (9. ábra). A

vad típusú sejtek 4,7-szer nagyobb nitrogénáz aktivitást mutattak WGA jelenlétében, mint WGA hiányában. A legerőteljesebb stimuláció a sejtek exponenciális növekedési fázisában volt megfigyelhető. A WGA stimuláló hatása dózisfüggő volt. A maximális fokozást akkor értük el, amikor a lektint $1 \mu\text{g WGA}/10^7$ sejt/ml táptalaj koncentrációban adtuk a sejtekhez (nem közölt adatok). A WGA⁻ törzs nitrogénkötő kapacitását a WGA hozzáadás nem emelte. A vad típusú és a WGA⁻ törzs hasonlóan, de lassan növekedett (9. ábra). Növekedési rátájukat a WGA jelenléte nem befolyásolta. A gyenge növekedés feltételezhetően a kultúrák korlátozott oxigén ellátásának volt a következménye.

Tudjuk, hogy az *A. lipoferum* mikroaerofil diazotróf baktérium, nitrogénkötéséhez az optimális oxigénkoncentráció 0,5 % (Okon és mtsai., 1976; Burris és mtsai., 1991). A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a WGA kötődése a baktériumhoz nem befolyásolja-e a nitrogénkötés oxigénkoncentráció optimumát (1. táblázat). Méréseink szerint mind a vad típusú, mind a WGA⁻ sejtek 0,5 % oxigénkoncentráció (0,48 kPa parciális oxigén nyomás a reakcióelegy fölötti térben) mellett kötötték leghatékonyabban a nitrogént. A vad típus esetén

1. táblázat. A WGA hatása a nitrogénkötés oxigénszükségletére vad típusú és WGA⁻ sejtekben.

Törzsek	WGA	Nitrogenáz aktivitás ^a		
		Oxigén koncentráció (%)		
		0,1	0,5	1,0
SpBr17R (vad típus)	-	395±42	528±48	207±18
	+	378±34	553±48	236±26
WGA ⁻	-	297±31	483±55	211±17
	+	322±28	467±44	186±18

^a nitrogenáz aktivitás (nmol C₂H₄/10⁷ sejt/ml) WGA hiányában (-) és WGA (1 µg/ml) jelenlétében (+).

ez az érték az irodalmi adatokkal jó egyezést mutatott (Okon és mtsai., 1976; Burris és mtsai., 1991). 0,1 és 1,0 % oxigénkoncentráció mellett csökkent nitrogenáz aktivitást mértünk. Ha a sejtekhez WGA-t adtunk, ez nem befolyásolta a nitrogénkötés optimális oxigénszükségletét, sem a vad típusban, sem a mutánsban.

5.1.4. A baktériumsejt felszínén található cukorcsoportok részvétele a nitrogénkötés fokozásában. Ismert, hogy a lektinek, a baktériumok sejt felszínén elhelyezkedő megfelelő lektinreceptorok terminális cukorcsoportjait ismerik föl és ezekhez kötődnek. Így először azt mértük föl, hogy milyen terminális cukorcsoportok találhatóak a vad típusú és a WGA⁻ sejtek felszínén. A felmérést differenciális lektinkötési vizsgálattal végeztük, különböző cukorkötési specificitású, FITC-vel jelölt lektineket használva (2. táblázat). A WGA–Neu molekulában a WGA elsődleges cukorkötőhelyét, a WGA–Glc molekulában mindkét cukorkötőhelyét előzetesen telítettük a megfelelő ligandummal (lásd Anyagok és Módszerek). A lektinek kötődését epifluoreszcens mikroszkópiával ítéltük meg.

A vad típusú sejtekhez, az UEAI kivételével, az összes lektin kötődött. Sejt agglutinációt egyetlen esetben sem figyeltünk meg (1 µg lektin/10⁷ sejt/ml koncentráció esetén) (nem közölt adatok). Ez arra utalhat, hogy a vad típusú sejtek felszínén terminális β(1→4)-kapcsolt GlcNAc_{di}, terminális α(2→3)- és/vagy α(2→6)-kapcsolt NeuNAc, GalNAc és/vagy α-laktozil-, α-mannozil- és/vagy α-glükozil csoportok találhatóak, de L-fukozil-α(1→2)Gal csoportok viszont nincsenek. A WGA-val, SNA-val, MAA-val kezelt sejtek lektinkötő kapacitása, amit specifikus fluoreszcencia intenzitásukkal ($E_{525}/10^7$ sejt/ml) mértünk, hasonló volt (3. táblázat). A WGA–Neu-val és DSA-val kezelt sejtek fluoreszcencia szintje csak 34 és 77 %-a volt (sorrendben) a WGA-val kezelt sejtekéinek. A WGA–Glc kezelés nem adott fluoreszkáló sejteket, mint az várható volt.

Hasonlóan a vad típusú sejtekhez, a WGA⁻ sejtek felszínét is teszteltük az FITC-jelölt lektinokkal. A WGA, WGA–Neu, WGA–Glc és DSA nem kötődött a sejtekhez, míg az SNA és MAA a vad típushoz hasonló kötődési mértéket mutatott (3. táblázat).

3. táblázat. A vad típusú és a WGA⁻ törzsek lektinkötő kapacitása.

Lektinek	Specifikus fluoreszcencia intenzitás ^a	
	vad típus	WGA ⁻
WGA	924±74	35±4
WGA–Neu	318±29	93±11
WGA–Glc	27±3	25±2
DSA	712±62	13±1
SNA	1025±68	852±99
MAA	907±56	983±98

^a($E_{525}/10^7$ sejt/ml). Három napos, minimál táptalajon növesztett sejteket festettünk FITC-vel jelölt lektinokkal (40 µg lektin/ 10^8 sejt/ml). A tenyészetek fluoreszcencia intenzitása lektin nélkül 15±2. Az értékek három független kísérlet átlagai.

Ha eredményeinket összevetjük a lektinek cukorkötő specifikusságával (2. táblázat), arra következtethetünk, hogy a vad típusú sejtek felületén a következő lektin–cukor kapcsolatok jönnek létre:

– a WGA, mindkét cukorkötő helyével, a sejt felszínen található láncvégi GlcNAc_{di} csoportokhoz kötődik. De fel kell tételeznünk, hogy az elsődleges cukorkötő helyével láncvégi NeuNAc csoportokhoz is kötődhet (de sosem egyidőben a GlcNAc kötődéssel), hiszen eredményeink ezt a lehetőséget nem zárják ki;

– a WGA–Neu és a DSA a sejt felszín terminális GlcNAc csoportjaihoz kapcsolódik;

– az SNA és MAA pedig a terminális NeuNAc csoportokhoz.

Mivel a WGA⁻ törzs kapcsolatba lépett az SNA-val és az MAA-val, de a WGA-val, WGA–Neu-val és DSA-val nem (3. táblázat), így valószínűleg a mutáns sejtek felszínén nincsenek, vagy szerkezetileg módosított GlcNAc csoportok vannak, ugyanakkor ép NeuNAc csoportok találhatók.

A következő lépésben megkíséreltük azonosítani, hogy a fenti kapcsolatok közül mely lektin–terminális cukor pár vagy párok vesznek részt a fokozott a nitrogénkötés kiváltásában. Meghatároztuk a vad típusú törzs különböző lektinek jelenlétében mutatott nitrogénkötését (10. ábra). A nitrogenáz aktivitás legnagyobb, 4,4-szeres növekedését WGA-val kaptuk. Alacsonyabb, de szignifikáns hatás volt megfigyelhető WGA–Neu és DSA stimulációra is (1,7 és 2,7-szeres aktivitás). Az SNA és MAA nem volt serkentő hatással a nitrogénkötésre. Ha megnézzük, hogy ezek a lektinek milyen cukorcsoportokhoz kapcsolódnak specifikusan (2. táblázat), akkor az eredményekből kiolvashatjuk, hogy a sejt felszín terminális GlcNAc_{di} cukorcsoportjai vesznek részt legvalószínűbben a nitrogénkötés stimulációjában. Hatékonyabb volt a serkentés, amikor ezek a csoportok a WGA mindkét cukorkötő helyéhez

kapcsolódtak (4,4-szeres), míg ha csak a másodlagos kötőhelyéhez (WGA–Neu-val tesztelve), akkor csak 1,7-szeres fokozást kaptunk (10. ábra).

Továbbá, a nitrogénkötésben nem következett be növekedés GMA és LCA hatására, azaz GMA–GalNAc/ α -laktozil- és LCA– α -mannozil-/ α -glükózil kapcsolatok esetén a sejtfelszínen (nem közölt adatok).

A WGA⁻ törzsben sem a WGA (9. ábra), sem a WGA–Neu és a DSA stimuláció (nem közölt adatok) nem emelte a nitrogénkötést. Tehát a lektinkötés hiánya (3. táblázat) és a nitrogénáz stimuláció elmaradása következetes volt.

Az *A. lipoferum* mellett, más diazotróf baktériumokban is elemeztük a WGA, DSA és SNA lektinek hatását a nitrogénkötésre, így a rokon asszociatív nitrogénkötő *A. brasilense*-ben, valamint a szabadon élő nitrogénkötő *Azotobacter vinelandii* és *Klebsiella pneumoniae* baktériumokban. Az *A. brasilense* Sp7 törzs nitrogénáz aktivitását a WGA hozzáadás 3,7-szeresre, a DSA 2,2-szeresre növelte, míg az SNA nem volt hatással a nitrogénkötésre (4. táblázat). A baktérium lektinkötő kapacitása hasonló volt az *A. lipoferum*-éhoz (3. táblázat). Ugyanakkor, ugyanezek a lektin ingerek nem befolyásolták az *A. vinelandii* UW136 és *K. pneumoniae* UNF122 törzsek nitrogénkötését, bár valamennyien jól kötődtek a sejtekhez (4. táblázat).

5.1.5. A lektinkötődés hatása a *nifH*, *nifA*, *glnB* és *glnA* gének expressziójára. Tudjuk, hogy az *A. lipoferum* nitrogénáz enzimének bioszintézise, a nitrogénáz enzimet kódoló *nif* gének megnyilvánulása

4. táblázat. Az *A. brasilense*, *A. vinelandii* és *K. pneumoniae* lektinkötő kapacitása és nitrogénkötése lektinek jelenlétében.

Lektin ^a	Nitrogenáz aktivitás ^b	Specifikus fluoreszcencia intenzitás ^c
<i>A. brasilense</i> Sp7 ^d		
lektin nélkül	1018±100	36±4
WGA	3767±452	1116±129
DSA	2239±300	1328±185
SNA	928±102	1273±162
<i>A. vinelandii</i> UW136 ^e		
lektin nélkül	5827±633	53±5
WGA	5619±455	2389±277
DSA	5932±375	2512±286
SNA	6002±587	2654±236
<i>K. pneumoniae</i> UNF122 ^f		
lektin nélkül	2864±332	27±2
WGA	3067±386	1854±202
DSA	2754±368	1634±199
SNA	2945±334	1889±213

^aLektin hozzáadás (1 µg/10⁷ sejt/ml) 2 óra, nitrogénkötési feltételek mellett tartott inkubáció után. Nitrogénkötés meghatározás (^d21, ^e14, ^f24) szerint. ^b(nmol C₂H₄/10⁷ sejt/ml), 4 órával a lektin hozzáadás után. ^c(E₅₂₅/10⁷ sejt/ml), 3 napos, szilárd táptalajon növesztett, FITC-vel jelölt lektinokkal (40µg/10⁸ sejt/ml) festett sejtek. Az értékek három független kísérlet átlagai.

transzkripció szintű szabályozás alatt áll (3. ábra). A következőkben tehát azt vizsgáltuk, hogy a lektin stimulusok nitrogénkötést szabályozó hatásukat vajon a *nifH*, *nifA*, *glnB* és *glnA* gének átíródásának módosítása révén fejtik-e ki. Választásunk a következők miatt esett ezekre a génekre. A *nifH* gén a nitrogénáz enzimet kódoló struktúroperon, a *nifHDK* tagja. A *nifA* gén terméke, a NifA fehérje, aktív formában, a *nifH* gén expressziójának pozitív szabályozója. A *glnB* gén terméke, a P_{II} fehérje a NifA fehérje aktivitásának szabályozásában vesz részt. A *glnA* gén pedig a glutamin szintetáz (GS) enzimet kódolja, ez az enzim készít a nitrogénkötési folyamat végtermékéből, az ammóniából glutamint, amely aztán a sejt további nitrogéntartalmú molekuláinak felépítéséhez szolgál forrásul.

A vad típusú és a WGA⁻ törzsekbe bevittük ezen gének promotereinek a β -galaktozidáz enzim génjével, a *lacZ* génnel alkotott transzkripció promotor fúzióit, azaz a *nifH-lacZ*, *nifA-lacZ*, *glnBA-lacZ* és *glnA-lacZ* promotor fúziókat, sorrendben a pAB358, pAB576, pAB904 és pAB912 plazmidokon. Mértük a plazmid-eredetű β -galaktozidáz aktivitást WGA, WGA-Neu, DSA, SNA és MAA stimuláció hatására, nitrogénkötési feltételek mellett.

A promotor aktivitásokat a vad típusú törzsekben vizsgálva azt kaptuk, hogy a WGA, WGA-Neu és DSA növelték a *nifH-lacZ*, *nifA-lacZ* és *glnBA-lacZ* fúziók expresszióját (10. ábra). Sorrendben a WGA, WGA-Neu és DSA ingerekkel kapott β -galaktozidáz aktivitások

a *nifH-lacZ* fúzió esetén 2,9-, 1,8-, és 1,8-szor,

a *nifA-lacZ* fúzió esetén 5,7-, 3,3- és 5,2-ször,

a *glnBA-lacZ* esetén 2,6-, 1,5- és 2,1-szer

voltak nagyobbak, mint a megfelelő nem stimulált β -galaktozidáz aktivitások. Észre kell vennünk azt is, hogy a WGA, WGA–Neu és DSA mindhárman azok a lektinek, melyek a baktérium sejtfelszín GlcNAc cukorcsoportjaihoz kapcsolódnak (2. és 3. táblázat). A NeuNAc-specifikus lektinek, így az SNA és MAA egyike sem befolyásolta egyik fúzió transzkripcióját sem. Továbbá, a *glnA-lacZ* fúzió expresszióját egyik lektin inger sem stimulálta (10. ábra).

A WGA⁻ törzsben, mint ahogy azt vártuk is, lektin stimulus hatására megnövekedett promoter–fúzió transzkripciót nem mutattunk ki (nem közölt adatok).

Mind a vad típusú, mind a mutáns háttérben kapott gén expressziós eredmények megegyezést mutattak a nitrogénáz enzim stimuláció eredményeivel (10. ábra).

Tudván, hogy a *nifH* gén átíródása közös a *nifDK* egységgel a *nifHDK* operonban, a *nifH-lacZ* fúziókkal kapott eredményekből logikusan kiolvasható volt, hogy a lektin inger hatására megnövekedett *nifH* gén expresszió több molekula dinitrogenáz reduktáz és dinitrogenáz termelődését eredményezi, mely elvezethet egy fokozott nitrogénkötéshez.

A *nifA* és *glnB* szabályozógének esete már nem volt egyértelmű. Semmi irodalmi hivatkozás nem utalt arra, hogyha az ezen génekről termelődő fehérjék nagyobb mennyiségben vannak jelen a sejtben, akkor

a nitrogénkötés nőni fog. Ezért a vad típusú törzsbe, extra kópiában, funkcionális, azaz teljes *nifA* és *glnB* géneket vittünk be, sorrendben a pAB53 és pAB914 plazmidokon és mértük a sejtek nitrogénkötését (5. táblázat). WGA stimulus hiányában, a nitrogénáz aktivitás 2,1-szer (*nifA*) és 2,4-szer (*glnB*) volt nagyobb, mint a szülőtörzsben, amiben a megfelelő génnek csak egy, kromoszómális kópiája volt található. A WGA hozzáadás a nitrogénkötésben további növekedést már nem eredményezett. A kísérletet, a vad típusúhoz hasonlóan, a WGA⁻ törzsben is elvégeztük. A mutáns törzs *nifA* és *glnB* merodiploid származékaiban hasonló szintű nitrogénkötő kapacitást mértünk, mint a vad típusú háttérben, WGA jelenlétében és hiányában egyaránt (5. táblázat).

5. táblázat. Extra kópia *nifA* (pAB53) és *glnB* (pAB914) géneket hordozó vad típusú és a WGA⁻ sejtek nitrogénkötése, WGA jelenlétében

Törzsek	Nitrogénáz aktivitás ^a	
	- WGA	+ WGA ⁽²⁾
SpBr17R (vad típus)	716±55	2019±170
SpBr17R (pAB53)	1520±142	1600±122
SpBr17R (pAB914)	1704±105	1533±86
WGA ⁻	663±61	624±43
WGA ⁻ (pAB53)	1459±157	1436±162
WGA ⁻ (pAB914)	1597±127	1653±113

^aLektin hiányában vagy 4 órával a lektin hozzáadás után mérve (nmol C₂H₄/10⁷ sejt/ml). Lektin hozzáadás (1 µg/10⁷ sejt/ml) 2 óra, nitrogénmentes táptalajban, 0,5 % oxigén koncentráció mellett végzett nitrogénáz derepresszió után. Az értékek három független kísérlet átlagai.

5.1.6. WGA-kötő komponens kimutatása és izolálása a baktérium sejt kapszulájából. Amikor a vad típusú sejteket fluoreszcens festékkel jelölt WGA-val kezeltük, majd a sejtek lektinkötését vizsgáltuk ultraibolya fényben epifluoreszcens mikroszkóppal (7. ábra), egyértelműen megmutatkozott, hogy a WGA döntően a sejtek kapszulájához kötődik. Ezért a WGA-kötő alkotóelemeket a sejt kapszulában, és elsőként annak is fehérje alkotórészei között kerestük. Megkíséreltük azonosítani a kapszuláris fehérjéket, és közöttük megtalálni a WGA-kötő komponenseket. A sejtekről kapszuláris anyagot oldottunk le és a preparátum fehérje komponenseit SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel szétválasztottuk (11. ábra).

A vad típusú és a mutáns kapszula preparátumok fehérjemintázatai hasonlóak voltak. Hat különálló polipeptid volt megfigyelhető. Meg kell jegyezni, hogy a 32 kDa komponens, intenzitása alapján, megfelelhet két, szorosan együtt vándorló polipeptidnek is. A 45 kDa polipeptid megegyezik az *A. lipoférum* 4B törzs laterális flagelláinak 45 kDa, a >116 kDa polipeptid némileg nagyobb, mint a 4B törzs poláris flagelláinak 110 kDa fehérjekomponensei (Alexandre és mtsai., 1999).

Hogy a kapszula mintázatokban WGA-kötő fehérjéket keressünk, a fehérjemintázatokat Western blot eljárással nitrocellulóz membránra vittük, majd a membránokat digoxigenin–konjugált WGA-val, enzim–immunodetekciós eljárással hívtuk elő (11B. ábra).

11. ábra. A feltételezett WGA-kötő receptor kimutatása. (A) A kapszula fehérjék vándorlási mintázata SDS-poliakrilamid gélben. (B) DIG-jelölt WGA-val előhívott Western blot. (C) Az SDS-PAGE mintázat Schiff festődése. a, vad típusú törzs; b, WGA⁻ törzs; M, molekulásúly mérték (kDa).

WGA-kötést mutató jelet csak a vad típusú preparátumban kaptunk. A jel megfelelt a fehérjemintázat 32 kDa polipeptidjének. A mutáns törzs kapszula preparátumának mintázatában WGA-t kötő komponenst nem találtunk. A vad típusú preparátumból készített SDS-PAGE mintázatot Schiff-festéssel is elemeztük (11C. ábra). Ez az eljárás a fehérjemintázatból a glikozilált polipeptideket mutatja ki, a fehérjék cukorcsoportjainak aldehiddé oxidálásával és az aldehidek specifikus

színreakcióval történő kimutatásával. A fehérjemintázatban egy Schiff–pozitív jelet kaptunk, amely a 32 kDa polipeptidnek felelt meg.

Következő lépésben, a vad típusú törzs kapszula preparátumából elválasztottuk a WGA-kötő alkotórészt. Ehhez WGA–affinitás kromatográfiai eljárást alkalmaztunk. A kapszula preparátumot agaróz–mátrix-hoz kötött WGA-val töltött kromatográfias oszlopra vittük. A WGA-hoz kötődni képes kapszula komponenseket a mátrix visszatartotta, mialatt a nem kötődő alkotórészeket a mátrixból kimostuk (áttörő frakció). Ezután a megkötődött komponenseket, a WGA cukorkötési specifikusságának megfelelően, nagy feleslegben adott *N*-acetil-D-glükózaminnal választottuk le a mátrixról (eluált frakciók). Mind az áttörő, mind az eluált frakciókat SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel elemeztük (12. ábra).

Így a vad típusú kapszula preparátumból egy 32 kDa molekulásúlyú fehérjét választottunk el, melyet az e2 és e3 eluált frakciókban mutattunk ki. Ez a fehérje ugyanakkor nem volt jelen az áttörő frakcióban. Ezért feltételezhető, hogy ezt a komponenszt a kapszula alkotórészek közül a WGA–mátrix specifikusan tartotta vissza. Az így elválasztott komponens molekulásúlyban egyezett a DIG–immunodetekciós kísérletben kimutatott WGA–kötő komponenssel (11. ábra).

12. ábra. A WGA-kötő receptor izolálása WGA affinitás kromatográfiával. A fehérjék vándorlási mintázata SDS-poliakrilamid gélben. (A) vad típusú törzs. (B) WGA⁻ törzs. n, nem frakcionált kapszula; t, áttörő frakció; e2, e3, eluált frakciók. M, molekulásúly mérték (kDa).

A WGA⁻ törzs kapszula preparátumával is elvégeztük az affinitás kromatográfiás elválasztást (12B. ábra). A frakciók SDS-PAGE elemzése megmutatta, hogy a 32 kDa komponens nem volt jelen az eluált frakciókban, vagyis nem kötődött a WGA-mátrixhoz. Ezzel szemben megjelent az áttörő frakcióban, ami szintén azt támasztja alá, hogy ezt a polipeptidet a WGA-mátrix nem tartotta vissza.

A WGA-immunodetekciós, a Schiff festési és a WGA-affinitás kromatográfiás kísérletek eredményei alapján feltételezzük, hogy a 32

kDa kapszula fehérje egy WGA-kötő receptor, vagy annak egy alkotóeleme lehet az *A. lipoferum* sejt felszínén.

5.2. Nitrogénkötő asszociációk rizsben és búzában: az *A. brasilense* és a *H. seropedicae* baktériumok kölcsönhatása magyar rizs és búza fajtákkal

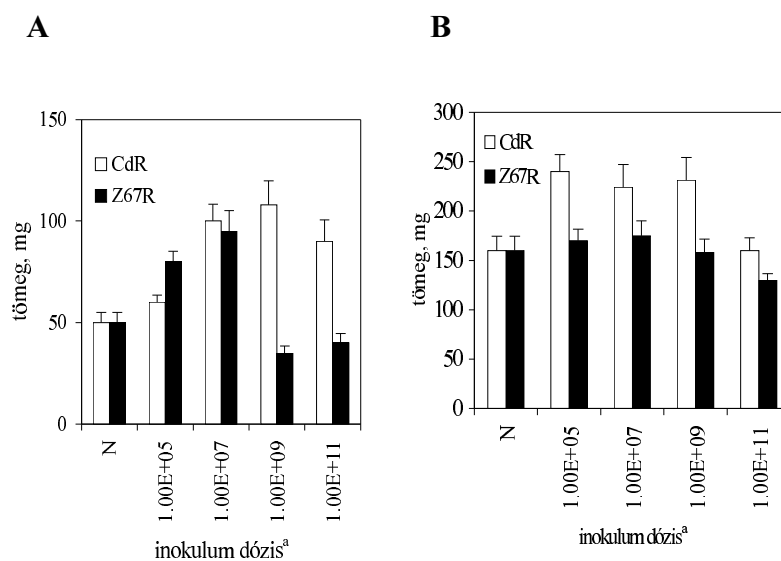
5.2.1. Pilóta kísérletek: optimális oltóbaktérium mennyiség becslés. Bevezető kísérletsorozatunkban két kérdésre kerestünk választ, mivel ide vonatkozó irodalmi adatok nem voltak ismertek:

- Pozitív hatással van-e a két baktérium faj oltása a növény növekedésre a kiválasztott magyar rizs- és búzafajták esetén?
- Ha igen, akkor milyen baktérium dózissal kell oltanunk a növényeket, hogy optimális növekedésserkentést érjünk el?

A kísérletekhez Karmina fajtájú rizs és Mv-23 fajtájú búza csíranövényeket neveltünk mesterséges táptalajon, kémcsőben. Három napos csíranövényeket oltottunk az *A. brasilense* CdR és a *H. seropedicae* Z67R törzsek folyadéktenyészetének különböző dózisaival. A gyökértömeg változást értékeltük, 28 nappal az oltás után (13. ábra).

Megállapítottuk, hogy a rizs növények gyökértömegét a CdR oltóanyag minden dózisa növelte. Leghatékonyabban akkor, ha 10^7 – 10^9 sejt/ml baktériumot oltottunk növényenként. Ekkor a növények gyökértömege 2,0–2,1-szeresre nőtt. Megfigyeltük, hogy még 10^{11}

sejt/ml baktérium is pozitív hatású volt. A Z67R oltóanyag kisebb, 10^5 – 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációban volt hatékony, 1,9-szeres legnagyobb



13. ábra. A CdR és Z67R törzsek folyadék oltóanyagainak hatása mesterséges táptalajon nevelt Karmina rizs (A) és Mv-23 búza (B) növények gyökértömegére, 28 nappal az oltás után. ^alg sejt/ml. N, nem oltott növény. Az oltóanyagok nitrogénáz aktivitása $1263 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt/ml (CdR törzs), $715 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt/ml (Z67R törzs) volt. Az értékek három független kísérlet három párhuzamosának átlagai. A hibásávok az átlagok standard eltérését mutatják.

gyökértömegű növényeket adva. 10^9 sejt/ml és ennél több baktérium oltása már visszavetette a gyökérfejlődést, közel felére csökkentve a gyökértömeget.

A búza növények gyökértömegét a CdR törzs széles, 10^5 – 10^9 sejt/ml dózistartományban, jelentősen, 40,0–50,0 %-kal növelte. Ennél több baktérium oltása már nem volt hatékony. A Z67R törzssel oltáskor 10^7 sejt/ml baktérium maximálisan 9,3 % gyökértömeg gyarapodást eredményezett. Nagyobb oltóbaktérium sűrűség már nem volt pozitív hatású. Sőt, hasonlóan a rizs oltáshoz, gyökértömeg csökkenést is okoztunk, ha 10^{11} sejt/ml baktériumot oltottunk a növényekre.

Az eredményekből kiolvasható volt, hogy mindkét baktérium oltása pozitívan hatott mind a rizs, mind a búza gyökérfejlődésére, azonban a jótékony hatás dóziszfüggő volt. Megállapítottuk, hogy 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációjú oltóanyagokkal lesz célszerű dolgoznunk mind a rizs, mind a búza növényházi tenyészedényes oltási kísérleteiben, mindkét oltóanyag esetén.

5.1.2. A rögzített (immobilizált) sejtes oltóanyagok előállítása és jellemzése. A tenyészedényes növényoltásokhoz a baktérium oltóanyagok két formáját használtuk: folyadéktenyészetet és rögzített sejtes kultúrát.

A rögzített sejtes oltóanyag előállításához a hordozóanyag preformált cellulózgyöngy (Mavicell N^R) volt. A rögzítést az Anyagok és Módszerek-ben leírtak szerint végeztük, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Molekuláris Genetika Csoportjával

együttműködve. A növényoltások előtt, a CdR és Z67R törzsek rögzített sejtes oltóanyagaival lombiktenyészetekben tartamkísérleteket végeztünk. A sejtrögzítés során az oltóbaktériumok a preformált cellulózgyöngy külső és belső mikropórusainak felületéhez kötődnek. A rögzült sejtek szaporodóképességüket hosszabb ideig megtarthatják, mint folyadéktenyészetben, ha a cellulózgyöngy mikropórusaiban kialakult mikrokörnyezet ezt kedvezően tudja támogatni. A lombikkísérletek célja az volt, hogy nyomon kövessük, hogy a baktériumot hordozó cellulózgyöngyökből mennyi ideig, milyen sejtszámú és nitrogénkötési kapacitású sejtpopuláció képes kiszaporodni. A rögzített sejtes oltóanyagot az Anyagok és Módszerekben leírtak szerint minimál táptalajba oltottuk (7 g rögzített sejtes cellulózgyöngy/100 ml táptalaj) és inkubáltuk. A kirajzott sejtpopulációt minden 48 órában eltávolítottuk a gyöngyök friss táptalajjal való mosásával. A tartamkísérletet ötven napig végeztük, a kirajzó populáció jellemzését a 2., 30. és 50. napon végeztük el, sejtszám és nitrogénáz aktivitás meghatározással (6. táblázat). A cellulózgyöngyök a tartamkísérlet során nem mállottak szét.

A rögzített CdR sejteket tartalmazó oltóanyag, még 50 nap elteltével is, közel azonos számú ($1,0-1,5 \times 10^8$ sejt/ml) és nem csökkent nitrogénáz aktivitású ($716-828 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt) sejteket termelt. Bár a rögzített Z67R sejteket hordozó oltóanyag is jelentős mennyiségű sejtet szolgáltatott ($5,9-8,0 \times 10^7$ sejt/ml), azonban a sejtek nitrogénkötése 64,2 %-kal csökkent a vizsgálati periódus végére (800 szemben $286 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt).

6. táblázat. Rögzített sejtes CdR és Z67R oltóanyagokból kiszaporodó baktérium populáció sejtkoncentrációja és nitrogénkötő kapacitása, lombikkísérletben

Napok	Sejtszám ^a	Nitrogenáz aktivitás ^b
CdR törzs		
2	$1,5 \pm 0,2 \times 10^8$	752 ± 49
30	$1,0 \pm 0,2 \times 10^8$	716 ± 53
50	$1,3 \pm 0,3 \times 10^8$	828 ± 83
Z67R törzs		
2	$5,9 \pm 0,3 \times 10^7$	800 ± 47
30	$6,3 \pm 0,3 \times 10^7$	426 ± 32
50	$8,0 \pm 0,2 \times 10^7$	286 ± 23

^asejt/ml a táptalajban. ^bnmol C₂H₄/10⁷ sejt. Nitrogenáz aktivitások (0. nap): 918 nmol C₂H₄/10⁷ sejt (CdR törzs) és 1005 nmol C₂H₄/10⁷ sejt (Z67R törzs). Sejtszám (0. nap): $2-8 \times 10^1$ sejt/ml táptalaj. Az értékek három független kísérlet átlagai.

5.2.3. Nitrogénkötő együttélések létrehozása és jellemzése.

Karmina, Sandora és Ringola rizsfajtákat, valamint Mv-23 búzafajtát oltottunk a CdR és Z67R törzsek folyadék és rögzített sejtes oltóanyagaival. A folyadéktenyészetek sejtszámát az 5.1.1. fejezetben leírtak szerint állítottuk be, a rögzített sejtes oltóanyagot különböző dózisokban alkalmaztuk. A növekedésserkentést a gyökér- és szártömegek mérésével jellemeztük, 28 nappal az oltás után. Leírtuk a baktériumok megtelepedését, és mértük nitrogénkötésüket a gyökérben és a szárban. Továbbá, nyomon követtük a baktériumok túlélését a rizoszférában. Megfigyeltük, hogy a rizoszférában, a rögzített sejteket

hordozó cellulózgyöngyök 28 nappal az oltás után még nem mállottak szét.

5.2.3.1. Rizs oltási kísérletek Karmina fajtával (14. ábra). A CdR törzs folyadéktenyésztéssel történt oltás 46,1 %, a rögzített sejtes oltóanyaggal való kezelés, felülmúlva a folyadéktenyésztet hatását, maximum 96,1 % gyökértömeg növekedést váltott ki (14A. ábra). A szártömeget a folyadéktenyésztéssel oltás 39,8 %-kal növelte. Az immobilizált sejtes oltóanyaggal való kezelés a szártömeget szintén pozitívan, de kevésbé befolyásolta (14,4–24,5 % növekedés). Mindkét oltóanyagforma sejtszetei hatékonyan kolonizálták a növényeket, mind a gyökérfelszínt, mind a növénybelsőket. A folyadék oltóanyag sejtjei legnagyobb számban a gyökérfelszínhez szorosan kötődve és a gyökér belső szöveteiben telepedtek meg ($5,0 \times 10^6$ sejt/100 mg gyökér) (2. frakció). Az immobilizált sejtes oltóanyagból kirajzó baktériumok

intenzíven kolonizálták a szár belső szöveteit is ($3,2 \times 10^6$ – $2,5 \times 10^7$ sejt/100 mg szár) (3. frakció). Mértük továbbá a kolonizáló baktériumok nitrogénkötését is a növények gyökerében és szárában (7. táblázat). A gyökeret kolonizáló baktériumok aktív nitrogénkötők voltak, függetlenül az oltóanyagformától (2856 – 3014 nmol $C_2H_4/10^7$ sejt nitrogeáz aktivitás). A szárat kolonizáló baktériumok nitrogeáz aktivitása némileg alacsonyabb volt a gyökeret kolonizálókénál (2312 – 2527 nmol $C_2H_4/10^7$ sejt).

7. táblázat. A kolonizáló baktériumok nitrogénkötése Karmina növények gyökerében és szárában

Oltás	Nitrogeáz aktivitás ^a	
	gyökér	szár
CdR törzs		
F ^b	3014 ± 342	2527 ± 82
20 ^c	2856 ± 200	2312 ± 56
Z67R törzs		
F ^b	1816 ± 160	1112 ± 42
10 ^d	2023 ± 291	1386 ± 37

^anmol $C_2H_4/10^7$ sejt, 28 nappal az oltás után. ^bfolyadék tenyészet. ^c20 gyöngynyi, ^d10 gyöngynyi rögzített sejtes tenyészet (lásd 14. ábrát is). Az értékek három független kísérlet két párhuzamosának átlagai. A nem oltott kontrol növényekben nitrogénkötés nem volt mérhető.

Amikor a Z67R törzs folyadék és immobilizált sejtes tenyészeteivel oltottunk Karmina növényeket, a kísérletsorozatok mindössze 67 %-ában kaptunk megbízható pozitív eredményt (14B. ábra). A folyadéktenyészet $2,6 \times 10^8$ sejtje (5ml) 37,9 %-kal, az immobilizált sejtes oltóanyag 10 gyöngynyi mennyisége, amely $1,5 \times 10^8$ sejtet tartalmazott a

cellulózgyöngyökhöz rögzítve, 74,7 %-kal nagyobb gyökértömeget eredményezett. Ennél több gyönggyel való oltás ($\geq 3,0 \times 10^8$ rögzített sejt) már nem váltott ki többletnövekedést. A folyadéktenyésztéssel kezelés jelentős, 45,7 %-os szárnövekedést adott, míg az immobilizált sejt kultúrával való oltás kevésbé volt hatékony (7,6–13,1 % növekedés). Hasonló mennyiségű sejtet jegyeztünk föl a gyökérfelszínhez lazán kötődve (1. frakció), illetve a gyökérfelszínhez szorosán kötődve és a gyökérbelsőben együttesen (2. frakció), függetlenül az inokulum formájától és dózisától ($1,2\text{--}3,2 \times 10^5$ sejt/100 mg gyökér). A szárban alacsony szintű sejtmegetelepődést találtunk ($3,2\text{--}6,4 \times 10^3$ sejt/100 mg szár). Hasonlóan a CdR törzs sejtjeihez, a gyökérben a kolonizáló baktériumok intenzíven kötötték a nitrogént ($1816\text{--}2023$ nmol $\text{C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt) (7. táblázat), meghaladva az oltóanyag *in vitro* nitrogénkötő kapacitását (vesd össze 14. ábra lábjegyzetével). A szárban élő baktériumok is aktív nitrogénkötők voltak ($1112\text{--}1386$ nmol $\text{C}_2\text{H}_4/10^7$ sejt).

Azonban ugyanazon kísérleti körülmények között, a kísérletek több mint egyharmad részében, a Karmina növények Z67R törzssel oltásának az előnye nem mutatkozott meg: a gyökértömeg nem növekedett, esetenként csökkent (37,5 %-kal), míg a szár nem vagy mérsékelten gyarapodott (8,1 %-kal) (nem közölt adatok). Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy különlegesen sok baktérium kolonizálta a szárbelsőt, főleg ha immobilizált sejt kultúrát használtunk. Akkor ez elérte az $5,0 \times 10^6$ sejt/100 mg szár értéket is (nem közölt adatok).

Továbbá, vizsgáltuk az oltóanyagok túlélését és nitrogénkötését a növények rizoszféra talajában is (8. táblázat). Láttuk, hogy a CdR oltóanyag, mindkét formában, az oltás utáni első héten drasztikusan pusztult. A kísérleti periódus végére azonban az immobilizált sejtes oltóanyagból kirajzó baktériumok száma már közel tízszeresen

8. táblázat. A CdR és Z67R törzsek túlélése a Karmina növények rizoszférájában

Napok az oltás után	Sejtszám a rizoszférában ^a				
	Inokulum dózis ^b				
	F	5	10	20	30
CdR törzs					
2	$3,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
7	$4,0 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
28	$8,8 \times 10^2$	$2,6 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$
Z67R törzs					
2	$2,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
7	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
28	$2,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
Nitrogenáz aktivitás ^c					
CdR törzs					
2	1318				1017
28	767	ND	ND	ND	1226
Z67R törzs					
2	1027				916
28	318	ND	ND	ND	582

^asejt/g rizoszféra talaj. A folyadék és immobilizált sejtes oltóanyagok kiindulási sejtkoncentrációja és nitrogénáz aktivitása a 14. ábra lábjegyzetéből. ^bOltás 5 ml folyadék (F) és 5, 10, 20, 30 gyöngynyi immobilizált sejtes kultúrával. ^cnmol C₂H₄/10⁷ sejt. Az értékek három független kísérlet átlagai. A standard eltérés minden esetben kevesebb volt, mint az adott érték 12 %-a.

meghaladta a folyadéktenyészet túlélő sejtjeinek számát ($2,6-7,5 \times 10^3$ szemben $8,8 \times 10^2$ sejt/g rizoszféra talaj). A Z67R törzs sejtjeinek megoszlása is hasonló mintázatot mutatott, de az immobilizált sejtes oltóanyag előnye itt nem mutatkozott meg, a baktérium túlélését nézve (8. táblázat). Míg a folyadék oltóanyagok sejtjei mindkét baktérium esetén jelentősen vesztek nitrogénkötési képességükből, addig a cellulózgyöngyön rögzített sejtekből kirajzó utódpopuláció a nitrogénkötési kapacitását hatékonyan őrizte meg (8. táblázat).

5.2.3.2. Rizs oltási kísérletek Sandora és Ringola fajtával. A Sandora és Ringola fajtákat a CdR és Z67R törzsek folyadéktenyészetével kezeltük.

Amikor a Sandora növényeket a CdR törzsszel oltottuk, 20,3 % gyökértömeg és 5,1 % szártömeg gyarapodást kaptunk (9. táblázat). Hasonló mennyiségű baktérium tapadt lazán a gyökérfelszínhez (1. frakció), mint a gyökérfelszínhez szorosan kötődött és a gyökérbelsőben megtelepedett baktériumok együttes száma (2. frakció) ($5,1 \times 10^6$ és $7,1 \times 10^6$ sejt/100 mg gyökér). Ugyanakkor feltűnően alacsony szárkolonizációt mutattunk ki ($2,6 \times 10^2$ sejt/100 mg szár).

A Z67R törzs oltás nem befolyásolta a gyökérnövekedést, azonban 15,3 % szártömeg gyarapodást váltott ki. A kolonizáló baktériumok eloszlása a növényben a CdR törzs megoszlási képével egyezett: $2,4 \times 10^6$ és $4,8 \times 10^6$ sejt/100 mg gyökér baktériumot számoltunk meg a gyökér 1. és 2. frakciókban, a 3. frakcióban pedig $2,6 \times 10^2$ sejt/100 mg szár baktérium telepedett meg.

A Ringola fajta oltásakor megállapítottuk, hogy a növények növekedését mindkét törzs oltása károsan befolyásolta (9. táblázat). 8,4 %-kal csökkent a gyökértömeg, szárnövekedést pedig nem találtunk. A

9. táblázat. A CdR és Z67R törzs oltásának hatása a Sandora és Ringola fajtára

		Inokulum ^b		
		nem inokulált	CdR	Z67R
Sandora fajta				
tömeg, mg	gyökér szár	113 ± 9 39 ± 2	136 ± 12 41 ± 2	113 ± 7 45 ± 4
CFU ^a	1. frakció		5,1±0,7 × 10 ⁶	2,4±0,2 × 10 ⁶
	2. frakció		7,1±0,8 × 10 ⁶	4,8±0,6 × 10 ⁶
	3. frakció		2,6±0,3 × 10 ²	6,5±0,5 × 10 ²
Ringola fajta				
tömeg, mg	gyökér szár	131 ± 11 43 ± 2	120 ± 13 44 ± 3	120 ± 15 43 ± 5
CFU ^a	1. frakció		5,7±0,5 × 10 ⁴	1,1±0,2 × 10 ⁶
	2. frakció		2,7±0,3 × 10 ⁵	4,9±0,3 × 10 ⁵
	3. frakció		1,5±0,5 × 10 ⁴	3,1±0,7 × 10 ³

^aCFU, a kolonizáló baktériumok száma 100 mg gyökérben/szárban.

^bOltás 5 ml folyadéktenyésztéssel. Baktérium megtelepedési mintázat: (1. frakció) a gyökérfelszínhez lazán kötődött; (2. frakció) a gyökérfelszínhez szorosan kötődött és a gyökérbelsőben megtelepedett baktériumok együttesen; (3. frakció) a szárbelsőben megtelepedett baktériumok. Az oltóanyagok sejtkoncentrációja és nitrogénáz aktivitása: 3,2 × 10⁷ sejt/ml és 2416 nmol C₂H₄/10⁷ sejt (CdR törzs); 2,2 × 10⁷ sejt/ml és 1526 nmol C₂H₄/10⁷ sejt (Z67R törzs). A nem inokulált növényekben oltóbaktériumot nem mutattunk ki. Az értékek három független kísérlet két párhuzamosának átlagai.

CdR törzs oltásakor a szárban tizedrésnyi kolonizáló baktériumot találtunk ($1,5 \times 10^4$ sejt/100 mg szár) (3. frakció), mint a gyökéren és a gyökérbelsőben ($2,7 \times 10^5$ sejt/100 mg gyökér) (2. frakció). A Z67R törzs sejtjei legnagyobb számban lazán kötődtek a gyökérfelszínhez ($1,1 \times 10^6$ sejt/100 mg gyökér) (1. frakció), a szárbelsőben ezredrésnyi baktériumot számláltunk ($3,1 \times 10^3$ sejt/100 mg szár) (3. frakció).

A 28 napos Sandora növények gyökerében mind a CdR törzs, mind a Z67R törzs sejtjei aktívan kötötték a nitrogént (2216 és 1116 nmol $C_2H_4/10^7$ sejt) (10. táblázat). A szárban is jelentős nitrogenáz aktivitást mértünk (1129 és 1152 nmol $C_2H_4/10^7$ sejt). A Ringola növényekben csak a CdR törzs sejtjei és azok is csak a gyökérben mutattak számottevő számottevő nitrogénkötést (1114 nmol $C_2H_4/10^7$ sejt).

10. táblázat. A kolonizáló baktériumok nitrogénkötése Sandora és Ringola növények gyökerében és szárában

Növény	Nitrogenáz aktivitás ^a	
	Oltóanyag ^b	
	CdR	Z67R
Sandora gyökér	2216 ± 186	1116 ± 160
Sandora szár	1129 ± 20	1152 ± 13
Ringola gyökér	1114 ± 42	527 ± 82
Ringola szár	156 ± 20	232 ± 26

^anmol $C_2H_4/10^7$ sejt, 28 nappal az oltás után. ^b 5 ml folyadéktenyészet (lásd 9. táblázat lábjegyzet). Az értékek három független kísérlet két párhuzamosának átlagai. A nem oltott növényekben nitrogénkötés nem volt mérhető.

Sem a Sandora, sem a Ringola növényeknél nem vizsgáltuk az oltóbaktériumok túlélését a rizoszférában.

5.2.3.3. Búza oltási kísérletek.

Az Mv-23 búzafajta oltását a CdR és a Z67R törzseknek mind folyadék, mind immobilizált sejtes kultúráival elvégeztük (15. ábra).

A CdR oltótörzsnek mindkét formája növelte a gyökértömeget (15A. ábra). Az immobilizált sejtes kultúrával kezelés hatékonyabban serkentette a növekedést. A folyadéktenyészet $3,1 \times 10^8$ sejtje (5 ml) 34,0 % gyökértömeg gyarapodást váltott ki. Ezzel szemben 20 gyöngynyi immobilizált sejtes oltóanyag, mely mindössze ötödrésznyi, $6,2 \times 10^7$ rögzített baktériumsejtet hordozott, közel megkétszerezte a gyökértömeget, de még 5 gyöngy oltása ($1,5 \times 10^7$ sejt rögzített sejt) is hatékony volt (26,6 % növekedés).

Szárnövekedés egyik oltóanyagformával sem volt megfigyelhető. Bár a rögzített sejtes oltóanyagból kirajzó sejtek hatékonyabban lepték el a gyökérfelszínt, mint a folyadéktenyészetéi ($5,0 \times 10^5$ szemben $2,5 \times 10^4$ sejt/100 mg gyökér), a kolonizációs szint azonban a megfelelő 2. frakciókban már közel azonos volt ($1,2-6,3 \times 10^6$ sejt/100 mg gyökér). Észrevehető továbbá, hogy a szárbelsőben, immobilizált sejtes oltóanyaggal oltáskor, csak tizedannyi baktérium telepedett meg, mint a folyadéktenyészetrel oltáskor ($1,6-8,0 \times 10^4$ szemben $4,0 \times 10^5$ sejt/100 mg szár).

Ezzel szemben a búza növények Z67R törzsszel oltása kifejezetten káros volt (15B. ábra). 28,3 % gyökértömeg csökkenés adódott a folyadéktenyészetrel oltáskor ($3,0 \times 10^8$ sejt). A rögzített sejtes kultúra negatív hatása is hasonló mértékű volt (33,1–24,8 % csökkenés), még a legkisebb dózisban is ($1,3 \times 10^8$ rögzített sejt). A szárnövekedés is visszamaradt mindkét oltóanyagforma alkalmazása esetén (6,0–22,5 % csökkenés). Főleg a nagy adagú rögzített sejtes oltóanyaggal oltás (20 gyöngy, benne $5,4 \times 10^8$ rögzített sejt,) káros hatása volt szembeszökő. A gyökérfelszín laza kolonizációjában lényeges különbség nem mutatkozott a két oltóanyagforma között ($2,5 \times 10^4-1,0 \times 10^5$ sejt/100 mg gyökér). Azonban folyadéktenyészetrel oltáskor a gyökér 2. frakció erőteljes invázióját tapasztaltuk ($6,3 \times 10^7$ sejt/100 mg gyökér). A szárbelsőben megtelepedett baktériumok száma $7,9 \times 10^4-7,9 \times 10^5$ sejt/100 mg szár között ingadozott, függetlenül az oltóanyagformától és dózistól.

A gyökeret kolonizáló CdR sejtek erőteljesen kötötték a nitrogént (4812 és 4556 nmol C₂H₄/10⁷ sejt), a szárban lakó sejtek mérsékeltebben (2827 és 2612 nmol C₂H₄/10⁷ sejt), függetlenül az oltóanyagformától (11. táblázat). A Z67R sejtek nitrogénkötése mérsékelt volt, mind a gyökérben, mind a szárban.

11. táblázat. A kolonizáló baktériumok nitrogénkötése az Mv-23 növények gyökerében és szárában.

Oltás	Nitrogenáz aktivitás ^a	
	gyökér	szár
CdR törzs		
F ^b	4812 ± 306	2827 ± 102
20 ^c	4556 ± 308	2612 ± 87
Z67R törzs		
F ^b	811 ± 113	513 ± 42
20 ^c	923 ± 190	696 ± 58

^anmol C₂H₄/10⁷ sejt, 28 nappal az oltás után. ^bfolyadék tenyészet. ^c20 gyöngynyi rögzített sejtes tenyészet (lásd 15. ábra is). Az értékek három független kísérlet két párhuzamosának átlagai. A nem oltott kontrol növényekben nitrogénkötés nem volt mérhető.

Az oltóbaktériumok túlélését a növények rizoszférájában vizsgálva a következőket találtuk (12. táblázat): a CdR törzs folyadéktenyészete 1 héttel az oltás után még közel az oltáskori sejtszám-szintet biztosította, azonban ez a vizsgálati periódus végére ezredrésznyre csökkent (7,6×10⁷ és 8,0×10⁴ sejt/g rizoszféra talaj). Az immobilizált sejtes oltóanyag 1 héttel az oltás után a folyadéktenyészettel megegyező mennyiségű baktériumot bocsátott ki a rizoszférába (1,2×10⁷–6,2×10⁷ sejt/g rizoszféra talaj), az oltási dózistól függetlenül. A vizsgálati periódus végére ez azonban már jóval meghaladta a folyadéktenyészettel

bejuttatott, még életképes sejtek számát: a legkisebb dózisban 1,8-szor ($1,5 \times 10^5$ sejt/g rizoszféra talaj), míg a legnagyobb dózisban 47,5-szer több ($3,8 \times 10^6$ sejt/g rizoszféra talaj) élő sejtet biztosított a rizoszférában. Nitrogénkötési aktivitásukat mindkét

12. táblázat. A CdR és Z67R törzsek túlélése az Mv-23 növények rizoszférájában

Napok az oltás után	Sejtszám a rizoszférában ^a				
	Inokulum dózis ^b				
	F	5	10	20	30
CdR törzs					
2	$3,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$
7	$7,6 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
28	$8,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
Z67R törzs					
2	$3,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$
7	$4,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$
28	$3,3 \times 10^1$	$4,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$
Nitrogenáz aktivitás ^c					
CdR törzs					
2	2266				1423
28	1228	ND	ND	ND	1857
Z67R törzs					
2	2444				841
28	218	ND	ND	ND	631

^a sejt/g rizoszféra talaj. A folyadék és immobilizált sejtes oltóanyagok kiindulási sejtkoncentrációját és nitrogénáz aktivitását lásd a 15. ábra lábjegyzetében. ^bOltás 5 ml folyadék (F) és 5, 10, 20, 30 gyöngynyi immobilizált sejtes kultúrával. ^cnmol $C_2H_4/10^7$ sejt, 28 nappal az oltás után. Az értékek három független kísérlet átlagai. A standard eltérés minden esetben kevesebb volt, mint az adott értékek 10,6 (sejtszám) és 13,5 %-a (nitrogénáz aktivitás).

oltóanyagforma szolgáltatotta sejtek egyformán megtartották (1228 és 1857 nmol C₂H₄/10⁷ sejt).

A Z67R törzs folyadéktenyésztete az oltás után egy héttel még jól túlélte (4,2×10⁶ sejt/g rizoszféra talaj), azonban a 4. hét végére erőteljesen lecsökkent a még élő sejtek száma és azok nitrogénkötése is (3,3×10¹ sejt/g rizoszféra talaj; 218 nmol C₂H₄/10⁷ sejt) (12. táblázat). A sejt immobilizálás, bár meghosszabbította az oltóanyagnak az életképes és nitrogént is kötő sejteket szolgáltató kapacitását, [5,0× 10³ sejt/g rizoszféra talaj és 631 nmol C₂H₄/10⁷ sejt (30 gyöngynyi oltóanyag)], azonban látható volt, hogy az oltóanyag így is erősen veszített a hatékonyságából.

6. Megvitatás

6.1. Az *A. lipoferum* kölcsönhatása a búza gyökérlektinnel, a búzacsíra agglutininnel (WGA) a nitrogénkötő asszociáció kialakulása során

Az *Azospirillum* és a gabonafélék közötti nitrogénkötő asszociáció létrejötte és működése az asszociatív partnerek egy sor kölcsönhatását igényli. Ebben a folyamatban fontos lépés lehet a gyökérlektinek és a baktérium sejtfelszín szénhidrát alkotórészeinek kölcsönhatása. A *Rhizobium*–hüvelyes növény szimbiózisban leírt lektin hipotézis szerint (Bohloul és Schmidt, 1976; Dazzo és Truchet, 1983) a lektinek a gazdanövény specificitás egyik meghatározói.

Az *Azospirillum* és a gabonanövények asszociációjában a lektinek szerepéről alig tudunk. A WGA, jól meghatározott cukorkötő specifikusságával (Miskind és mtsai., 1983), az egyik legjobban jellemzett tag a gabonafélék szorosan rokon lektinjeinek családjában. A sejtfelismerésben betöltött szerepén kívül, a WGA kötődés a sejt számos más metabolikus és fiziológiai aktivitását is befolyásolja (összefoglalva Pusztai, 1991).

Az *A. brasilense* és az *A. lipoferum* sejtek felszínén WGA–kötő receptorok jelenlétét feltételezték, epifluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok alapján. A WGA kötés mértéke változott a tenyészetek korától és a táptalaj szénforrásának minőségétől függően. Az *A. brasilense* lektinkötésében bizonyos fokú specificitást is jeleztek (Del

Gallo és mtsai., 1989; Del Gallo és Haegi, 1990). Lehetséges WGA–kötő komponenseket, GlcNAc tartalmú lipopoliszacharid–fehérje és poliszacharid–lipid komplexeket választottak el a baktérium sejt kapszulájából és folyadéktenyészetéből (Skvortsov és Ignatov, 1998).

Munkánkhoz az *A. lipoferum* és a búza gyökérlektin, a búzacsíra agglutinin (WGA) modellrendszert választottuk, hogy *in vitro* tanulmányozzuk a baktérium és a gyökérlektin közötti kapcsolatot, a baktérium lektin felismerését és –kötését, és az ebből a kölcsönhatásból eredő sejt válaszokat.

Három tényezőt elemeztünk összefüggéseikben:

- a lektinek cukorkötő specifikusságát,
- a baktérium lektinkötő receptorában a cukor oldalláncok minőségét,
- a lektinkötés stimuláló hatását a nitrogénáz aktivitásra és bizonyos, nitrogénkötésben résztvevő, N-szabályozott gének expressziójára.


Így betekintést nyertünk a búza és az asszociatív baktériuma közötti kommunikáció molekuláris eseményeinek néhány elemébe.

Továbbá, eredményeink megvitatásra érdemes gondolatokat ébresztettek még:

- a lektin és a bakteriális receptor közötti specifikus kémiai illeszkedést illetően,
- és a target funkcióra (nitrogénkötésre) irányuló, lektin stimulálta jel természetére vonatkozóan is.

Munkánkban kimutattuk, hogy két GlcNAc-specifikus lektin, a WGA és a DSA tudja fokozni az *A. lipoferum* nitrogénkötő kapacitását, valószínűleg, miután a lektinek komplexet képeznek a megfelelő recepttorral a baktériumsejt felszínén. Amikor a lektin–baktérium kölcsönhatás gátolt, mint a WGA⁻ törzsben látjuk, a lektin kötésből eredő, és a nitrogénkötés szabályozási folyamatába belépő inger is hiányzik (9. ábra). Az inger a növényvel asszociációban élő diazotrófokra, így az *A. lipoferum* és *A. brasilense* baktériumokra hatott, míg a szabadonélő nitrogénkötőkre, az *A. vinelandii* és *K. pneumoniae* baktériumokra nem (4. táblázat). A lektinek oldaláról vizsgálva érdemes meglátnunk azt is, hogy az *Azospirillum* gazdanövényei közül (Fages, 1994) nemcsak a búza lektinje rendelkezik GlcNAc cukorkötési specifikussággal. Szintén specifikusan GlcNAc coker csoportokat köt a rizs gyökérlektin (Wilkins és Raikhel, 1989), a kukorica lektin (Huynh és mtsai., 1992), a paradicsom (Pusztai, 1991) és a csicsereborsó (Kolberg és mtsai., 1983) lektinek is.

6.1.1. A WGA-kötődés feltételezett szerepe a nitrogénkötés szabályozásában (16. ábra). A WGA inger a *nifH-lacZ*, *nifA-lacZ* és *glnBA-lacZ* génfúziók expressziójában vált ki növekedést, és ebből következően egy fokozott nitrogénáz aktivitást (10. ábra). Feltételezhető, hogy a WGA/receptor komplexről eredő stimulus a *nifA* gén transzkripcióját fokozza. Az még nyitott kérdés, hogy a jel a gén promoterével milyen kapcsolatban áll. Az kizárható, hogy a jel a promoterhez a nitrogén-háztartás összehangolásában

16. ábra. WGA-kötődés indukálta események az *A. lipoferum* sejtben. A lehetséges jelátviteli útvonalak (vastag nyilak) és azok célpontjai a nitrogénkötés szabályozási rendszerében.  , gén DNS szakasz promoterével.

résztevő NtrB/NtrC kétkomponensű szabályozó rendszeren keresztül kerül, hiszen ez a promoter működését nem befolyásolja (de Zamaroczy, 1985).

A megnövekedett mennyiségű NifA aktivátor fehérje feltehetőleg növeli a *nifH* gén expresszióját. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogyha a vad típusú sejtekben többletben termeltettünk NifA fehérjét, akkor az ténylegesen növelni volt képes a sejtek nitrogénáz aktivitását, amit azonban WGA hozzáadással tovább emelni már nem lehetett (5. táblázat).

Tudjuk, hogy a NifA fehérje aktív formában vesz részt a *nifH* átíródás bekapcsolásában. A NifA aktiválásában a központi szignál transzmitter, a P_{II} fehérje vesz részt, ami a *glnB* gén terméke. Kísérleteink megmutatták, hogy a WGA/receptor komplex szülte jel a *glnB* gén fokozott transzkripcióját is kiváltja, a nitrogénkötési feltételek mellett működő *glnBp2* promoterről. Így több P_{II} termelődik a sejtben, a többlet P_{II} protein pedig, szintén aktív formába alakulás után, elősegítheti az extra mennyiségű NifA fehérje inaktív formából aktív formává alakulását. Ezt támasztja alá, hogy amikor a vad típusú sejtekben a P_{II} fehérje sztoichiometrikus arányát megnöveltük a NifA fehérjéhez viszonyítva, a nitrogénáz aktivitás akkor is megnőtt (5. táblázat). Ez összhangban van azzal a nem teljesen bizonyított feltételezéssel, hogy a NifA egy lehetséges fehérje–fehérje kölcsönhatás révén aktiválódik, ami a NifA N-terminális doménje és az aktív P_{II} fehérje között jön létre (Arsene és mtsai., 1996).

A P_{II} fehérje aktiválása reverzibilis uridilálással történik. Azonban sem az uridiláló enzim, sem annak génje még nem ismert. Így azt sem tudjuk, hogy a WGA-kötődés indukálta jel vajon kapcsolódik-e a P_{II} aktivitásának a szabályozásához. Jelenlegi tudásunk szerint, nitrogénkötési feltételek mellett, a P_{II} , mint központi jelátvivő molekula, két ponton lép be a nitrogénkötés szabályozási folyamatába: a NifA aktivitás szabályozása révén, valamint saját promoterének N-státusztól függő autoszabályozása folytán. A P_{II} fehérjéről nincs jelátvitel az NtrB/NtrC rendszerhez, és a P_{II} nem vesz részt a glutamin szintetáz (GS) aktivitásának alakításában sem. Tehát a WGA-indukálta és P_{II} fehérje közvetítette jelzés továbbhaladása számára ezek az utak lezártak.

Tovább követve a WGA-szülte inger lehetséges útját a szabályozási kaszkádban, az *ntrC* promoter is célpont lehet. A gén megnyilvánulását WGA inger jelenlétében nem vizsgáltuk. A gén maga nem esszenciális a nitrogénkötéshez. Terméke, az NtrC fehérje nem szabályozza olyan fontos elemeknek, mint a *nifA*, *glnA*, *glnB* géneknek a megnyilvánulását. Bár a *glnZ* génnek (a *glnB* struktúrhomológjának) a megnyilvánulását irányítja, de ennek a génnek és termékének funkciója a nitrogénkötésben még homályos. Az NtrC nem vesz részt a GS aktivitás szabályozásában sem. Ezzel szemben szerepe van a nitrogénáz enzim inaktiválásában ammónia túlsúly esetén, de a mi lektin/baktérium receptor kísérleti modellünk működését nitrogénkötési feltételek között elemeztük.

Kanyarodjunk vissza az eddig vázolt jelátviteli útvonalhoz. Tudjuk, hogy a sejtben a fokozott nitrogénáz aktivitás végeredménye a nagyobb mennyiségben termelődő ammónia. Mi lesz ennek az ammóniának a sorsa? Glutaminná történő bioszintetizálása megkövetelheti többlet GS enzim jelenlétét a sejtben. Azonban az enzimet kódoló gén promotere, a plazmid-eredetű *glnAp* promoter nem válaszol a WGA ingerre (10. ábra), tehát erről a promoterről nem íródik át több enzim molekula. Tudjuk viszont, hogy a *glnA* gén a *glnB* génnel közös átírási egységben található és megnyilvánulása két promoter, a *glnAp* és a *glnBp2* szelektív szabályozása alatt áll (3. ábra). WGA inger hatására azt találtuk, hogy a *glnBp2* promoterről viszont nagyobb mennyiségben termelődik *glnBA* mRNS (10. ábra). Ennek a többlet mRNS-nek a transzlációja már szolgáltat extra mennyiségű glutamin szintetáz molekulát a többlet ammónia glutaminná asszimilálásához. Nitrogénkötési feltételek mellett az enzim aktív állapotban termelődik, tehát működéséhez egy előzetes aktiválásra, mint a NifA vagy a P_{II} fehérjék esetén, nincs szükség. A rokon *A. brasilense* baktériumban mérték WGA stimulus hatására megnövekedett GS enzim aktivitást (Antonyuk és mtsai., 1993).

Áttekintve a WGA-kötődés indukálta jel lehetséges útvonalait, felmerül a kérdés: hogyan terjed a jel a WGA/receptor komplexről a target gének felsőbb szabályozó régióihoz? Vajon független jelátviteli utakkal szembesülhetünk a megcélzott promoterek felé vagy egy közös jelátviteli út indul a WGA-kötő receptorról, amely út aztán később ágazik szét egy "információs csomópont"-nál a megfelelő gének felé (16. ábra). Ennek kiderítése a további munka egyik iránya.

Baktériumban működő, gyökérlektin-indukálta jelátviteli utakat nitrogénkötő növény–baktérium együttélésekben alig ismerünk. Nemrégiben közöltük a búzacsíra agglutininnek az itt bemutatott szerepét a nitrogénkötési folyamat szabályozásában, föltehetőleg egy, a növény és a baktérium közötti szignál transzdukciós mechanizmus révén (Karpati és mtsai., 1999). Emlős sejtekben jól ismert, hogy a WGA–kötődésből eredő jel befolyásolja a sejtfelismerést, a glükóz transzportot, a lipolízist, a sejtek morfológiai állapotának szabályozását, előidéz sejtnövekedés gátlást, transzkripciós faktorok aktiválását. Néhány, lektin-indukálta szignál transzdukciós utat is leírtak (Danilov és Cohen, 1989; San Jose és mtsai., 1990; Wright, 1992). Kimutatták, hogy lektinkötő receptorként működő glikoproteinekben a cukor oldalláncok felelősek a biológiai információ leolvasásáért és továbbításáért (Gabiús, 1991; Kornberg és mtsai., 1991). Ez jó összhangban van a mi következtetésünkkel: a WGA–kötő receptor GlcNAc cukorcsoportjai a specifikus receptor alkotóelemek a nitrogénáz stimuláció kiváltásában.

6.1.2. Specifikus cukor struktúrák a baktérium sejt felszínén és szerepük a nitrogénkötés fokozásában. A lektinek cukorkötő specifikusságának ismerete lehetővé teszi számunkra, hogy elemezzük a lektinkötő receptor szénhidrát oldalláncait, azokban különös tekintettel a véghelyzetű csoportokra (Goldstein és mtsai., 1980). Eredményeink így a WGA és az *A. lipoferum* WGA–kötő receptora közötti specifikus kémiai felismerés megértéséhez is hozzájárulhatnak. A WGA és a receptor közötti kötési határfelületen a GlcNAc_{di} csoportok a specifikus receptor komponensek, ők felelősek a biológiailag aktív információ leolvasásáért,

amely aztán a sejt nitrogénkötését szabályozó gépezetbe továbbbátódik. Ezek a cukorcsoprtok, a kötési határfelületen, a WGA elsődleges és másodlagos cukorkötőhelyeibe 1,2,3 alkötőhely orientációban illeszkednek (17. és 6. ábra). Bár véghelyzetű NeuNAc csoportok szintén vannak a vad típusú sejtek felszínén, mint ahogy ezt a sejtek SNA és MAA kötése bizonyítja, azonban ezek a cukorcsoprtok feltehetőleg nem vesznek részt a WGA megkötésében: a WGA⁻ törzs sejtjeihez kötődik az SNA és az MAA, de a WGA, WGA-Neu és DSA nem (3. táblázat). Ezek a NeuNAc csoportok a nitrogénkötés stimulációjáért sem felelősek, mint ahogy ezt láttuk az SNA és a megfelelő receptor, illetve az MAA és a megfelelő receptor közötti kölcsönhatásokból, mind a vad típusú, mind a WGA⁻ törzsben (10. ábra).

Kitűnt, hogy a receptor kapcsolata a WGA elsődleges és másodlagos cukorkötő helyeivel nem azonos értékű a biológiai jel aktivitására nézve. Az a receptor molekula, amely kizárólagosan a WGA másodlagos kötőhelyeihez kapcsolt (WGA-Neu és receptor kölcsönhatás), a teljes nitrogénkötés fokozásnak csak 38 %-át produkálta (10. ábra). Ez jó egyezést mutat a baktérium csökkent WGA-Neu kötő kapacitásával (3. táblázat). Ez az alacsonyabb szintű stimuláció következhet abból, hogy a WGA molekula másodlagos cukorkötő helyei kevésbé kitettek a receptor megfelelő cukorcsoprtjai számára, így közöttük kötődés nehezebben jöhet létre (Wright, 1980).

17. ábra. Határfelületi kapcsolódás a biológiailag aktív jelet indukáló WGA/receptor komplexben. A receptor GlcNAc_{di/tri} végződésű cukor oldalláncainak illeszkedése a WGA elsődleges és másodlagos cukorkötőhelyéhez, 1,2,3 alkötőhely orientációban.

Bár mind a WGA/receptor, mind a DSA/receptor komplex GlcNAc típusú kapcsolat, mégis a DSA kötődés sokkal kevésbé hatékony a nitrogénkötés fokozásában (10. ábra). Ismert, hogy néhány WGA–indukálta biológiai funkciót a WGA és a receptor között létrejött GlcNAc kapcsolatok moláris mennyisége is módosít (Lovrien és Anderson, 1980). Hemagglutináció gátlás mérési vizsgálatokkal a DSA molekulán két GlcNAc kötőhelyet becsültünk (nem közölt adatok), míg a WGA molekulán négy ilyen kötőhely található. Így az is feltételezhető, hogy a WGA és a DSA eltérő stimuláló képessége a WGA és a receptor, valamint a DSA és a receptor közötti kötési határfelületen kialakuló eltérő számú GlcNAc kapcsolatból adódik.

6.1.3. A baktérium feltételezett WGA–kötő receptoráról. A vad típusú sejtek kapszulájának fehérje alkotórészeit

enzim-immunodetekciós és WGA-affinitás kromatográfiás vizsgálatokkal elemezve, a kapszulában WGA-kötő receptorként, vagy annak alkotórészeként, egy 32 kDa molekulatömegű polipeptidet azonosítottunk (11. és 12. ábra), amely, Schiff-reakciójának megfelelően, egy glikozilált protein (11. ábra). A WGA⁻ mutáns törzs kapszulafehérje mintázatának összehasonlítása azt mutatta, hogy abban is megtalálható egy 32 kDa polipeptid, ez azonban nem mutat WGA-kötő képességet (11. és 12. ábra). Mivel a mutáns törzs transzpozon beépülést hordoz, joggal vártunk egy csonka receptorfehérjét, az inszerciós mutáció poláris hatásának következtében. Ezzel szemben, a hibás receptorfehérje molekulásúlya megegyezik a vad típuséval. Ez azt mutathatja, hogy a mutáció nem a receptorfehérjét kódoló struktúrgént inaktíválta. Lehetséges, hogy a fehérje cukormintázata a hibás. Mivel a receptor megfelelő glikozilációja előfeltétele a WGA-kötésnek, így az azon hiányzó vagy hibás cukor oldalláncok meggátolhatják a kötés létrejöttét a WGA molekula cukorkötőhelyeivel. Azt sem lehet kizárni azonban, hogy a receptorfehérje aminosav sorrendje a hibás a fehérje glikozilációs helyein, így a glikoziláló enzim azokat nem képes fölismerni. De magának a glikoziláló enzimnek a hibája vagy hiánya is előfordulhat.

6.1.4. A WGA/receptor és a Nod faktor/receptor rendszer. A WGA cukorkötő specifikusságának ismeretében feltételezhető, hogy az *A. lipoférum* WGA-kötő receptorán GlcNAc di(tri)mer végződésű cukor oldalláncok találhatók. Érdekes meglátásra jutottunk, amikor összehasonlítottuk a (GlcNAc)₃ molekula kémiai szerkezetét a *Rhizobium*

baktérium Nod faktorának szerkezetével. Ahhoz, hogy megtegyük ezt az összevetést, tekintsük át mindkét molekula szerkezetét részletesebben.

Tudjuk, hogy a WGA-kötő receptor GlcNAc végződésű cukor oldalláncai a WGA elsődleges kötőhelyéhez a következőképpen kapcsolódnak (6. és 17. ábra): a cukor oldallánc véghelyzetű (nem redukáló vég) GlcNAc csoportja az 1-es, a láncban második GlcNAc a 2-es alkötőhelyhez. A kötődésben az 1-es alhelyhez kapcsolódás a legerősebb, a döntő.

Ismernünk kell azt is, hogy a láncvégi GlcNAc molekula mely atomcsoportjai szükségesek az 1-es alhelyhez kapcsolódáshoz? (18. ábra): hidrogénhidak alakulnak ki (sorrendben a cukor és a kötőhely atomcsoportjai között):

- a glikozidos NH– csoport és a Glu₁₁₅ aminosav karboxil csoportja között,
- az acetyl csoport karbonil oxigénje és a Ser₆₂ OH csoportja között,
- a C–3 szénatomon lévő OH csoport és a Tyr₇₃ OH csoport között.

Valamint az acetyl csoport metil gyökét a His₆₆ és Tyr₆₄ aminosavakhoz gyenge, van der Waals erők kötik (Wright, 1984). Ezeket az atomcsoportokat a 19A. ábrán besatírozás jelzi.

18. ábra. A GlcNAc dimer illeszkedése a WGA elsődleges cukorkötőhelyének 1-es alkötőhelyéhez. A szaggatott vonalak a H-híd kötések jelölik (Wright, 1984).

A Nod faktorok a *Rhizobium* baktérium extracelluláris jelmolekula családja, a hüvelyes gazdanövényel történő kommunikációban (LeRouge és mtsai., 1990), a nóduszképződés korai eseményeiben, a gyökérszőr görbülés kiváltásában, az infekciós szál képzésben vesznek részt. A Nod faktor $\beta(1\rightarrow4)$ -kapcsolt GlcNAc tri/tetramer csontvázú molekula (Roche és mtsai., 1991) (19B. ábra). Ehhez a csontvázhoz, kitüntetett helyeken, különleges helyettesítések kapcsolódnak, megadván a molekula azon képességét, hogy specifikusan, a saját gazdanövényével lépjen kapcsolatba (Spaink és mtsai., 1991). Az egyik fontos ilyen helyettesítés a molekula nemredukáló végén található GlcNAc *N*-

acilációja, amikor a GlcNAc acetyl csoportját különféle telítetlen zsírsavak helyettesítik, a *Rhizobium* fajtól függően (R1).

Ha összehasonlítjuk a Nod faktor alapvázát az *A. lipoferum* WGA-kötő receptorának GlcNAc végződésű cukor oldalláncaival, könnyen észrevehetjük, hogy a két molekula alapcsontváza azonos (19. ábra). A lényegi különbség a nemredukáló véghelyzetű GlcNAc acetyl csoportjánál van. A WGA-hoz kapcsolódáskor ennek az acetyl csoportnak érintetlennek kell lenni. A Nod faktorok pedig pontosan ezen az acetyl csoporton hordozzák a gazdaspecifikus zsírsav helyettesítéseket (R1).

Lehetséges, hogy a GlcNAc oligomer (chitooligoszacharid) csontváz egy sokkal általánosabb struktúra a nitrogénkötő baktérium–növény együttélésekben, a baktérium és a növény közötti kommunikációban, mint amennyit eddig tudunk róla? Lehetséges, hogy két irányban is, mintegy "jel–egyenirányító" működik? Hiszen az nyilvánvaló, hogy az információátvitel a *Rhizobium* és az *Azospirillum* rendszerekben ellentétes irányú: a Nod faktor a baktériumból a növénybe továbbít információt, míg az *A. lipoferum* WGA-kötő receptora a növénytől a baktériumba. Nemrégiben derítették ki, hogy a Nod faktor is lektinhez kötődik a gyökéren, néhány hüvelyes növényben (*Dolichos biflorus*, *Medicago sativa*, *Lotus japonicus*) (Etzler és mtsai., 1999; Roberts és mtsai., 1999).

19. ábra. A WGA-kötő receptor GlcNAc_{tri} végződésű cukor oldalláncának (A) és a *R. meliloti* Nod faktor molekulájának (B) szerkezete. A besatírozott atomcsoportok szükségesek a WGA elsődleges és másodlagos cukorkötőhelyeinek 1-es és 2-es alkötőhelyeivel alkotott kémiai kötésekhez.

A komplex cukor szerkezetek az *Azospirillum* felszínén szerepet játszhatnak a baktérium és a gazdanövény gyökere közötti sejtfelismerésben és adhézióban. Speciális felületi mintázatokként szolgálhatnak a növényi jelmolekulák, például a gyökérlektinek számára. Ezeknek a jelmolekuláknak a szelektív kötődése a sejtfelszínhez információt továbbíthat a növényből a baktériumba, bonyolult és eddig még ismeretlen szignál transzdukciós útvonalakon keresztül. Így, a búzalektin és *Azospirillum* kölcsönhatás tanulmány modellként szolgálhat a nitrogénkötő asszociatív szimbiózisok kialakulásának pontosabb megértéséhez.

6.2. Nitrogénkötő asszociációk rizsben és búzában: az *A. brasilense* és a *H. seropedicae* baktériumok kölcsönhatása magyar rizs és búza fajtákkal

A környezet és természet védelme a műtrágyák fokozott adagolásának káros hatásaitól új megközelítésű megoldásokat vár a növények nitrogéntáplálására. A gabonafélék nitrogénszükségletének részleges biztosítása biológiailag kötött nitrogénnel egy ilyen fejlesztési irány lehet, a termésmennyiség szinten tartása, esetenként még növelése mellett is. A környezet- és energiakímélő baktérium oltóanyagok hatékony alapanyagai lehetnek az *A. brasilense* és *H. seropedicae* baktériumok.

A nemzetközi szakirodalom széleskörűen tárgyalja az *Azospirillum* oltás hatását számos gabonafélére (búza, kukorica, rizs, árpa, cirok, köles), néhány hüvelyes növényre (csicseriborsó, lóhere, lucerna) és egyéb kultúrnövényre is (napraforgó, paradicsom, mustár) (összefoglalva Fages, 1994).

Dolgozatomban az *A. brasilense* és a *H. seropedicae* nitrogénkötő baktériumok asszociatív szimbiózisát mutatom be három magyar rizs- és egy magyar búzafajtával. Hasonló közlemények magyar kultúrnövény fajták *Azospirillum* oltásáról és az oltás hatásának elemzéséről alig találhatók.

Eredményeink nyilvánvalóan mutatják az *Azospirillum* oltás jótékony hatását. Ez a megnövekedett gyökértömegben és a laterális gyökerek számának gyarapodásában nyilvánul meg, amihez esetenként nagyobb szártömeg is párosul. Ez egyrészt a baktérium által termelt és a gazdanövénynek továbbított hormon jellegű molekulák, elsősorban az indol-3-ecetsav növekedést serkentő hatásának, másrészt a növény nitrogéntáplálásának köszönhető (Michiels és mtsai., 1989). Szem előtt kell tartanunk, hogy kísérleteink a növények első négy hetes növekedésének elemzésére korlátozódtak. Ebben az időszakban a növények nagobbrészt az előző kedvező hatását használják ki.

Ugyanakkor, ahogy a kísérletekből kitűnt, a *Herbaspirillum* oltások eredményessége rapszodikus.

Az egyes rizsfajták válasza az oltásokra azt hangsúlyozzák, hogy a jótékony hatás nagymértékben függ a gazdanövény fajtájától, genetikai

hátterétől. (Búza fajtákkal végzett összehasonlító munkákról még nem tudunk beszámolni, a kísérletek részben folyamatban vannak.)

A Karmina és Sandora növények hasznát látták a CdR törzssel oltásnak. Jelentős gyökértömeg gyarapodást mutattak mind folyadék, mind rögzített sejtes oltóanyaggal oltáskor (14. ábra, 9. táblázat). A baktérium növényben való megoszlását nyomon követve láthatjuk, hogy az mindkét fajtában a szárban is képes volt megtelepedni (14. ábra, 9. táblázat). Rizs növények *Azospirillum brasilense* oltásakor a baktérium megjelenését a szárban nemrégiben közöltük (Rethati és mtsai., 2000). Érdeemes még észrevennünk azt is, hogy a baktérium szárkolonizáló kapacitása különböző a két fajtában. Tízezerszer több baktérium telepedett meg a Karmina növények szárában, mint a Sandora növényekében (10^6 sejt szemben 10^2 sejt/100 mg szár) (14. ábra, 9. táblázat).

Az *Azospirillum* baktériummal ellentétben, a két rizsfajta és a *H. seropedicae* baktérium nitrogénkötő asszociációja már sokkal kiegyensúlyozatlanabb rendszerként viselkedik, annak ellenére, hogy ez a baktérium a rizs természetes diazotróf endofitája, trópusi, szubtrópusi területeken. A Sandora növények megbízható szártömeg gyarapodással válaszoltak a Z67R törzssel oltásra, miközben gyökérnövekedésük nem változott (9. táblázat). Ugyanakkor kimutattuk, hogy a szárban csak erősen korlátozott számban telepedtek meg a kolonizáló baktériumok (10^2 sejt/100 mg szár). A Karmina növények Z67R törzssel oltásakor, a kísérletsorozatok egy részében jelentős gyökértömeg gyarapodást kaptunk, melyhez mérsékelt szártömeg növekedés is társult (14. ábra).

Máskor, ugyanazon kísérleti körülmények között, az oltás nem volt hatással a gyökér növekedésére, vagy éppen gyökértömeg csökkenést váltott ki (nem közölt adatok). A kolonizáló baktériumok növénybeni megoszlását elemezve kitűnt, hogy amikor az oltás jótékony hatású volt, akkor a szárban csak korlátozott számban telepedtek meg a baktériumok (maximum 10^4 sejt/100 mg szár) (14. ábra). Ezzel szemben a gyökernövekedésben visszamaradt növények szárát elárasztották a baktériumok (maximum 5×10^6 sejt/100 mg szár) (nem közölt adatok). Feltételezhető, hogy az együttélés változóan sikeres volta eredhet egy, a fajtán belül, az egyes növényegyedek közötti nagy variabilitásból is, az endofita baktérium asszociáció eltűrésének tekintetében.

Mind a Karmina, mind a Sandora fajtákban a növényben élő baktériumok aktív nitrogénkötők voltak (7. és 10. táblázat). Bár a biológiailag kötött nitrogén beépülését a növénybe nem vizsgáltuk, (hiszen 4 hetes növényekben ez még megbízhatóan nem mérhető), azonban ez mégis egy potenciális nitrogéntáplálási forrást jelezhet a gazdanövénynek, a baktériumból a növénybe továbbított ammónia és egyéb nitrogéntartalmú molekulák révén. Fontosnak tartom meglátni, hogy a Karmina növényekben, a jótékony hatású együttélésekben, mind az *A. brasilense*, mind a *H. seropedicae* sejtek fajlagos nitrogénkötése jelentősen meghaladta a baktériumok *in vitro* körülmények között, növény nélkül mért nitrogénkötését (7. táblázat és 14. ábra lábjegyzete). Feltehetőleg a fajta genetikai, fiziológiai háttere bőkezűen szolgálja az együttélés működtetését, energiával ellátását.

A Ringola fajtára egyértelműen káros a CdR és a Z67R törzssel oltás is, ami a növények gyökértömeg csökkenésében nyilvánult meg (9. táblázat). A CdR oltóanyag sejtjei közel egyenletesen kolonizálták az egész növényt, azonban a Z67R sejtek korlátozott megtelepedése a szárbelsőben itt is megfigyelhető volt.

Az Mv-23 búzafajta a két nitrogénkötő baktériummal való együttélésre gyökeresen eltérő választ ad (15. ábra). A növények CdR törzssel oltása megbízhatóan növelte a gyökértömeget. Elsősorban a laterális gyökerek mennyisége gyarapodott. Ugyanakkor a szártömeg alakulását a baktérium egyáltalán nem befolyásolta. A rögzített sejt oltóanyag igen hatékony volt. A baktériumok növénybeni megoszlását nézve kitűnik, hogy a baktériumok döntő mértékben szorosan a gyökérfelszínhez kapcsolódva és a gyökérbelső szöveiben telepedtek meg (10^6 sejt/100 mg gyökér). Századrésznyi baktérium kolonizálta a szárbelső (10^4 sejt/100 mg szár). A gyökérben mért fajlagos nitrogénkötés jóval magasabb volt az oltóanyaghoz az *in vitro* nitrogénkötési kapacitásánál (11. táblázat és 15. ábra lábjegyzete).

Ugyanakkor, a növény a Z67R törzssel való együttélése kimondottan károsodik, ezt mutatja az oltás hatására fellépő jelentős gyökértömeg csökkenés (15. ábra). Ez a mesterséges táptalajon növelt növényeknél is megfigyelhető volt (13. ábra). Sem az oltóanyagforma, sem az oltási dózis nem befolyásolta az ártalmas hatást. A növény kolonizációs mintázatát vizsgálva az a tendencia azonban észrevehető, hogy egy alkalommal és nagy mennyiségű sejttel oltva a növényeket, mint a folyadéktenyésztéssel oltás esetén, a baktériumok elárasztják a

gyökérfelszín és a gyökérbelső. Korlátozottabb megtelepedés alakul ki egy feltételezhetően lassúbb ütemű és egyenletesebb oltóbaktérium adagolásnál, azaz a rögzített sejtes oltóanyag alkalmazásánál.

Az együttélések elemzéséből láthatjuk, hogy a fajok és az egyes fajták különböző képességgel, hajlammal rendelkeznek, hogy a baktériumok nitrogénkötő asszociációját támogassák, akár a rizoszférájukban, akár magában a növényben. Ezt mutatja a *H. seropedicae* baktérium rapszodikus, nem kiegyenlített hatása a különböző rizsfajtákra, sőt még egy fajtán belül is (Karmina), és a Ringola fajta teljes összeférhetetlensége mindkét diazotróf baktériummal. Tudjuk, hogy a növény–nitrogénkötő baktérium rendszerekben, az együttélés szabályozásában, a növény partner is részt vesz, igaz, eltérő mértékben. A részvétel aránya összhangban van a növény és a baktérium közötti kapcsolat szorosságával és specifikusságával. A *Klebsiella pneumoniae* megélése és nitrogénkötése a rizoszférában nem igényel növényi eredetű génműködéseket (összefoglalva Kim és Rees, 1994). Ugyanakkor a *Rhizobium*–hüvelyes növény szimbiózisokban, a *Rhizobium* gének mellett a gazdanövény számos, már ismert génje is elengedhetetlen a nitrogénkötés szabályozásában (összefoglalva Bladergroen és Spaink, 1998). A gabonafélék és az *Azospirillum/Herbaspirillum* közötti asszociatív szimbiózisokban alig ismertek a gazdanövény részéről szükséges genetikai feltételek. Nemrégiben közöltük, hogy az *Azospirillum*–búza nitrogénkötő együttélés működését egy gyökérlektin gén expressziója befolyásolja (Karpati és mtsai., 1999). A nitrogénkötő asszociációt támogató hajlam

(nitrogen fixation supportive trait, *nis*) fajták közötti nagy variabilitását a rizs (Rethati és mtsai., 2000) mellett egyéb gabonafélékben is tapasztalták, így búzában, cirokban, kukoricában is, amikor a növényeket *Azospirillum* törzsekkel oltották (Rennie, 1981; Von Bulov és Dobereiner, 1975; Belimov és mtsai., 1995).

Felismerhető az a tendencia is, hogy a gazdanövény szabályozni igyekszik a kolonizáló baktériumok megtelepedését a növényben. Ez elsősorban a szárban volt megfigyelhető, a *H. seropedicae* kolonizációjakor. Ebben feltehetőleg energiagazdálkodási szempontok is szerepet játszanak. A bakteriális nitrogénkötés, vagyis a levegő molekuláris nitrogénjének ammóniává redukálása energiafárasztó folyamat (16 mol ATP/mol N₂ redukció). A növény támogatni köteles a baktériumot ennek az energiának az előállításában. Tápanyagokkal, szerves savakkal, cukrokkal táplálja a baktériumot, ami jelentősen megterheli saját energiaháztartását is. Ugyanakkor a két, eltérő életmódú baktérium faj kolonizációs erélye is eltérő. Egy nagyfokú *A. brasilense* kolonizációt még jól tolerálnak mind a búza növények (15. ábra), mind a Karmina és Sandora rizs növények (14. ábra, 9. táblázat), sőt még hasznot is húznak az együttélésből. A harmonikus együttélés az endofita *Herbaspirillum*-mal nehezebben valósul meg. A szárbelső kolonizációs mintázatainak elemzése azt mutatja, hogy az együttélés akkor hasznos, ha a növény korlátozni képes a baktérium megtelepedést. A Sandora fajtában ez a korlát, és hozzá társulva a hasznos együttélés, biztosítottnak látszik (9. táblázat). A Karmina fajta viszont megmutatta, hogy nem képes kiegyensúlyozott viszonyt kialakítani a baktériummal, a

gazdanövény felismerési és lehetséges védekezési reakciói, valamint a baktérium ezzel szembeni toleranciája nincs egyensúlyban az együttélésben. Amikor korlátozott baktérium megtelepedést találtunk a szárban, akkor hasznos volt az együttélés (14. ábra). Ha viszont a baktérium drasztikus inváziója játszódott le, akkor az asszociáció kedvezőtlenül hatott a növények növekedésére (nem közölt adatok).

Hasznos növény–baktérium együttélésekben is gyakran megfigyelhetők patogén- vagy parazitaszerű kölcsönhatások, hiperszenzitív reakció válaszok, melyeket a baktériumok tömeges belépése vált ki (Reinhold és mtsai., 1986; Reinhold és Hurek, 1988). A *H. seropedicae* kolonizáció kiváltotta átmeneti növénynövekedés elnyomást és patogénszerű kölcsönhatásokat a cirok és a köles növényekben is tapasztalták (Dobereiner és mtsai., 1993). Más szerzők búza fajtáknál írták le a növény genotípus és a növénybelsőben megtelepedő baktériumszám összefüggését (Belimov és mtsai., 1995).

Érdekes, hogy a *H. seropedicae* a Karmina növényekben a gyökértömeg növekedését, míg a Sandora növényekben a szártömeg gyarapodást fokozza. Bár a baktérium növénynövekedést serkentő képessége már dokumentált (Dobereiner és mtsai., 1993), de a stimulációért felelős molekulákat még nem azonosították. Föltételezhető azonban, hogy ez a baktérium is, az *Azospirillum*-hoz hasonlóan többféle növekedésserkentő hatású molekulát termel és adott gazdanövény háttérben ezek egymáshoz való aránya, így a gazdanövényre gyakorolt összhatás is eltérő lehet.

A további munkához jelenleg készülnek olyan *A. brasilense* és *H. seropedicae* törzsek, melyeket *gfp* riportergénnel jelölünk. A konstitutív, illetve nitrogén-szabályozott promoter-*gfp* fúziókat hordozó baktériumok biztonsággal azonosíthatók lesznek a kolonizált növény mikroszkópos vizsgálatakor, valamint mutatni fogják a működő nitrogénáz enzim bioszintézist is a kolonizáló baktériumokban. Ezek a vizsgálatok segíteni fogják a kolonizációs mintázatok pontosabb leírását, az együttélésben folyó nitrogénkötés további elemzését. Így kiegészítői lesznek a jelen dolgozatban alkalmazott, a baktériumok mennyiségi megoszlását leíró vizsgálati módszereknek.

A növényoltási kísérletekben 28 napig követtük a növények növekedését a baktériummal való együttélésben. Ebben a korai fázisban a növényre gyakorolt pozitív hatást döntően a baktérium termelte növekedésserkentő anyagok váltják ki. Bár génexpressziós vizsgálatok támasztják alá, hogy a nitrogénáz enzim termelődik (Vande Broek és mtsai., 1993; Arsene és mtsai., 1994), sőt az enzimaktivitás is már mérhető, a biológiailag kötött nitrogén növénybe történő beépülésének mennyiségi mérése (beltartalmi vizsgálatok, N-mérleg, ¹⁵N-jelzett N-forgalmi vizsgálatok) ebben a korban megbízhatóan még nem végezhető. Inkább szabadföldi kísérletekben, a termésbetakarítás után történik ezen paraméterek mérése (Boddey, 1987; James, 2000).

Az *Azospirillum* oltóanyagtermelés agrotechnikai szempontjait nem hangsúlyozzák kellőképpen. A rögzített sejtes oltóanyagforma elősegítheti az oltóbaktérium túlélését és a védelmét a talajban, növelheti versenyképességét az őshonos mikroorganizmusokkal szemben a

rizoszférában. Az immobilizált sejtes forma folyamatos sejtszolgáltatása a csírázó magok és csíranövények környékén nemcsak előnyös, de szükséges is, hiszen a növények ebben a növekedési/fejlődési szakaszban a legfogékonyabbak a kolonizáló baktériumok befogadására. Továbbá, ez a forma megkönnyíti az oltóanyag időbeni, könnyű és pontos kivételét a talajba.

Munkánkban a rögzített sejtes oltóanyagok előállításához egy környezetbarát, a talaj mikroflóra által lebontható vivőanyagot, a nagy mikroporozitású, preformált cellulózgyöngyöt választottuk. Lombiktenyészet vizsgálataink megmutatták, hogy az *A. brasilense* oltóanyag, rögzített sejtes formában, 50 napig folyamatosan nagyszámú és nagy nitrogénkötő kapacitású sejteket szolgáltat (6. táblázat). Ennél hosszabb idejű megfigyeléseink egyelőre nincsenek. A *H. seropedicae* sejtek már érzékenyebbek a rögzített sejtes állapot eltérésében. Bár a cellulózgyöngyökből nagyszámú sejt rajzolt ki, azok azonban jelentősen veszítettek nitrogénkötő képességükből (6. táblázat).

Az *A. brasilense* oltóanyag esetén a rögzített sejtes forma alkalmazása biztosította nagyszámú és nitrogénkötő oltóbaktérium folyamatos kirajzását a rizoszférába (8. és 12. táblázat), és feltehetőleg ennek is eredményeképpen a baktériumok hatékony megtelepedését a növényben (14. és 15. ábra), mind a rizsnél, mind a búzánál. A *H. seropedicae* esetében, a rögzített sejtes forma nem múlta fölül a folyadék oltóanyag hatását a baktérium megtelepítésében, sem a növényben, sem a gyökérkörnyezetben (14. és 15. ábra), viszont előnyösen befolyásolta az

oltóanyagból kirajzó populáció nitrogénkötő kapacitásának a megőrzését, mindkét növény rizoszférájában (8. és 12. táblázat).

Összegezve kitűnik tehát, hogy a rizs és a búza hatékony együttélését nitrogénkötő baktériumokkal mind a gazdanövény genotípusa, mind a baktérium életmódja befolyásolja.

Az Európai Unió néhány országában, főleg Franciaországban és Olaszországban, a gabonafélék termesztésében már használnak *Azospirillum*, vagy *Azospirillum* baktériumot is tartalmazó kevert mikrobiális oltóanyagokat (Fages, 1994). Kézenfekvőnek tűnik ezek hazai kipróbálása, valamint saját oltóanyagok fejlesztése is. Akármelyik, vagy mindkét utat is választjuk, eredményeink éppen arra hívják föl a figyelmet, hogy az oltóanyagok vizsgálatát körültekintően kell elvégezni, hogy megtaláljuk a valóban kompatibilis oltóbaktérium és növényfajta partnereket, hogy valóban hatékonyan és meglehetősen megbízhatóan tudjuk kamatoztatni a nitrogénkötő asszociációk nyújtotta előnyöket. A mikrobiológusok mellett, a növénynemesítők számára is egy kihívás lehet a növényfajták, egyes növényegyedek nitrogénkötést támogató jellegében (nis) megmutatkozó nagy genetikai variabilitás, amely egy tárházként szolgálhat a mikrobiális nitrogénkötő asszociációkat jól hasznosító növénypartnerek szelekciójához.

7. Összefoglalás

A gabonafélék termesztésében egy környezetbarát és energiatakarékos megoldás lehet a növények részlegesen biológiailag kötött nitrogénnel való táplálása. Az asszociatív nitrogénkötő baktériumok, az *Azospirillum brasilense* és *Azospirillum lipoferum*, valamint az endofita nitrogénkötő *Herbaspirillum seropedicae* ígéretes jelölt nitrogénkötő asszociációk létrehozására rizsben és búzában. Egy ilyen asszociáció kialakulásában számos kölcsönhatás működik a növény és a baktérium között, melyeket mind a partnerek genetikai jellemzői, mind a talaj- és környezeti tényezők befolyásolnak.

A jótékony asszociáció létrejöttében meghatározó lépés a baktérium sejt és a gyökérfelszín közötti felismerés. A gyökérfelszínen expresszálandó lektinek támogatják a kolonizáló baktériumok megkötődését, mert különbséget képesek tenni a különféle baktériumok sejt felszíni cukorkomponensei között, így ismerve fel a megfelelő baktérium partnert. Leírtuk a felismerés specifikusságát a búza gyökérléktin, a WGA és az *A. lipoferum* sejt felszínén azonosított WGA-kötő receptor között. A WGA-kötő receptort, egy 32 kDa fehérjét, a sejt kapszulában mutattuk ki. A receptor bevezető jellemzését is elvégeztük. Bizonyítottuk a baktérium megnövekedett nitrogénkötő kapacitását a WGA-kötődés következtében. Ehhez a WGA-kötéssel kiváltott stimuláló hatáshoz a receptor *N*-acetyl-glucosamin dimer (GlcNAc_{di}) végződésű cukor oldalláncai szükségesek. A stimulációs ráta függött a WGA és a receptor közötti határfelületen kialakult kötések

számától. A receptor illeszkedő cukorlánc és a WGA elsődleges cukorkötő helye közötti kapcsolat nagyobb stimuláló hatással bírt, mint a másodlagos cukorkötő hellyel kialakított kapcsolódás. Azonosítottuk a WGA indukálta inger néhány célgénjét (*nifH*, *nifA*, *glnB*) a megfelelő promoter-*lacZ* fúziókkal kapott megnövekedett gén expressziók alapján. A WGA/receptor komplexről eredő jel a *nifH* és *nifA* gének, valamint a *glnBA* géncsoport fokozott megnyilvánulásához vezetett, míg a *glnA* gén átírására, annak saját promoteréről, nem volt hatással. Jó okunk van feltételezni, hogy egy WGA-kötés indukálta szignál transzdukciós kaszkád kapcsolódik a nitrogénkötés szabályozási rendszeréhez a baktériumban.

Együttélést alakítottunk ki három magyar rizs és egy búzafajta, valamint az *A. brasilense* és az *H. seropedicae* között és jellemeztük a nitrogénkötő asszociatív szimbiózisok jótékony hatását. Leírtuk a baktériumok megtelepedését a növényekben, és ennek hatását a növények növekedésére. A fajták eltérő hajlamot mutattak az asszociáció elfogadására, ahogy ez gyökér- és szárnövekedésükben megmutatkozott. A kolonizáló baktériumok megtelepedési mintázata a növényekben korrelált a gazdanövény válaszokkal. Az *A. brasilense* növekedésserkentő hatása egyértelmű volt, míg a *H. seropedicae* rapszodikus növényi válaszokat váltott ki.

Továbbá, kifejlesztettük az oltóanyagok rögzített sejtes formáját is, és jellemeztük ezek hatékonyságát. A cellulózgyöngy alapú oltóanyag részecskék, mint "mikroinkubátorok" a talajban, elláthatják a baktérium védelmét, támogathatják annak versenyképességét a gyökérkörnyezetben.

8. Résumé

Partial nitrogen supply by biologically fixed nitrogen may well be an environment friendly and energy-saving improvement in production of cereals. The associative diazotrophic bacteria *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*, and the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* can be promising candidates to establish efficient nitrogen fixing associations with wheat and rice. Numerous interactions between the plant and the bacterium function in the formation of such an association, affected either by genetic determinants of the partners or by environmental conditions of the soil.

In the formation of the beneficial association, the recognition processes between the bacterium cell and the root surface are decisive. Lectins, expressed on the root surface, support the selective binding of the colonizing bacteria, since they are able to distinguish among the cell surface sugar moieties of various bacteria, thus recognizing the appropriate bacterium partner. We describe the specificity of the recognition event between the wheat root lectin, WGA and the WGA-binding receptor on the surface of *A. lipoferum* cells. A putative WGA-binding receptor, a 32 kDa protein, was detected in the cell capsule. Its preliminary characterization is also described. As a consequence of the WGA-binding, we also report evidence of an enhanced nitrogen fixation capacity of the bacterium. The stimulatory effect, induced by WGA binding, required *N*-acetyl-glucosamine dimer (GlcNAc_{di}) terminated sugar side chains of the receptor. The stimulation

rate was dependent on the number of GlcNAc_{di} links involved in receptor/WGA interface. Linking between the cognate sugar moiety of the receptor and the primary sugar binding sites of WGA had a larger stimulatory effect than binding to the secondary sites. Several target genes of the WGA-induced stimulus (*nifH*, *nifA*, *glnB*) were identified by enhanced expression of the corresponding promoter-*lacZ* fusions. The WGA/receptor complex generated stimulus led to elevated transcription of the *nifH* and *nifA* genes and of the *glnBA* gene cluster but not of the *glnA* gene from its own promoter. There may well be a signaling cascade contributing to the regulation of nitrogen fixation.

The interaction between *Azospirillum* and WGA may contribute to the adhesion of the bacteria on the root surface, establishing a nitrogen fixing association of improved efficiency with the host plant.

Associations of various Hungarian rice and wheat cultivars were established with *A. brasilense* and *H. seropedicae* and characterized for the beneficial effect of the associative symbioses. We described the establishment of bacteria within the plantlets, and as a consequence of this association, the effect on growth of plantlets. The cultivars expressed different capability to accept the associations, as manifested in root and shoot growth. Established pattern of the colonizing bacteria within the plantlets well correlated with the host plant responses. Growth promoting effect of *A. brasilense* was unambiguous, while *H. seropedicae* elicited rhapsodic plant reactions.

Moreover, immobilized inoculum formulæ was developed and its efficiency was ascertained. The cellulose bead-based inoculum particles

may function as "microincubators" in the soil, supporting the protection and competitiveness of bacteria in the root environment.

9. Irodalomjegyzék

- Alexandre, G., Rohr, R. and Bally, R. 1999. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4701-4704.
- Allen, A. K., Neuberger, A. and Sharon, N. 1973. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. *Biochem. J.* 131:155-162.
- Antonyuk, L. P., Fomina, O. R., Galkin, M. A. and Ignatov, V. V. 1993. The effect of wheat germ agglutinin on dinitrogen fixation, glutamine synthetase activity and ammonia excretion in *Azospirillum brasilense* Sp 245. *FEMS Microbiol. Lett.*, 110:285-290.
- Antonyuk, L. P., Fomina, O. R. and Ignatov, V. V. 1997. Effect of wheat lectin on the metabolism of *Azospirillum brasilense*: induction of protein synthesis. *Microbiology (Russia)*, 66:172-178.
- Arsac, J. F., Lamothe, C., Mulard, D. and Fages, J. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum* inoculation: effects of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie*, 10:649.
- Arsene, F., Katupitiya, S., Kennedy, I. R. and Elmerich, C. 1994. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7:748-757.
- Arsene, F., Kaminski, P. A. and Elmerich, C. 1996. Modulation of NifA activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.*, 178:4830-4838.
- Arsene, F., Kaminski, P. A. and Elmerich, C. 1999. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P_{II}: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179:339-343.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. and Doebereiner, J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.*, 29:924.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L. and Doebereiner, J. 1986a. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a

- root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 86-93.
- Baldani, V. L. D., Alvarez, M. A., Baldani J. I. and Dobereiner, J. 1986b. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*, 90:35-46.
- Baldani, J. I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M. and Dobereiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum species 3*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46:802-810.
- Bashan, Y. and Levanony, H. 1989a. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.*, 35:936-944.
- Bashan, Y. and Levanony, H. 1989b. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.*, 135:2899-2908.
- Bashan, Y., Levanony, H. and Klein, E. 1986. Evidence for a weak external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 132:3069-3073.
- Bashan, Y., Levanony, H. and Whitmoyer, E. 1991. Root surface colonization on noncereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum* Cd. *J. Gen. Microbiol.*, 137:187-196.
- Bastarrachea, F., Zamudio, M. and Rivas, R. 1988. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.*, 34:24-29.
- Beijerinck, M. W. 1925. Uber ein *Spirillum* welches freien Stickstoff binden kann. *Centralb. Bakt. II Abt.*, 2:353.
- Belimov, A. A., Kunakova, A. M., Khamova, O. F., Postavskaya, S. M., Sokova, S. A., Gruzdeva, E. V., Votrobyov, N. I. and Kozhemyakov, A. P. 1995. Survival of associative bacteria on roots and efficiency of inoculation under various environmental conditions, p. 751. *In* Tikhonovich, A., Provorov, N. A., Romanov, V. I., Newton, W. E. (eds.), *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

- Benelli, E. M., Souza, E. M., Funayama, S., Rigo, L. U. and Pedrosa, F. O. 1997. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol., 179:4623-4626.
- Berge, O., Fages, J., Mulard, D. and Balandreau, J. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. Symbiosis, 9:259.
- Bladergroen, M. R. and Spaink, H. P. 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. Curr. Opin. Plant Biol., 4:353-359.
- Bohlool, B. B. and Schmidt, E. L. 1976. Immunofluorescent polar tips of *Rhizobium japonicum*: possible site of attachment or lectin binding. J. Bacteriol., 125:1188-1194.
- Boddey, R. M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae.
- Boddey, R. M., Baldani, V. L., Baldani, J. I. and Dobereiner, J. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum spp.* on nitrogen accumulation by field grown wheat. Plant Soil, 95:109.
- Boddey, R. M., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, V. L. D. and Dobereiner, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant Soil, 174:195-209.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D. and Pharis, R. P. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol., 90:45-47.
- Bremer, E., Janzen, H. H. and Gilbertson, C. 1995. Evidence against associative nitrogen fixation as a significant N source in long-term wheat plots. Plant Soil, 175:13-19.
- Burris, R. H. 1972. Nitrogen fixation - assay methods and techniques. Methods Enzymol., 24B:415-431.
- Burris, R. H., Hartmann, A., Zhang, Y. and Fu, H. 1991. Control of nitrogenase in *Azospirillum sp.* Plant Soil, 137:127-134.
- Chalk, P. M. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. Plant Soil, 132:29-39.
- Ciopraga, J., Gozia, O., Tudur, R., Brezuica, L. and Doyle, R. J. 1999. *Fusarium sp.* growth inhibition by wheat germ agglutinin. Biochem. Biophys. Acta, 1428:424-432.

- Costacurta, A. 1995. Genetic studies on the auxin hypothesis in the *Azospirillum*/plant interaction. Dissertations de Agricultura, Leuven.
- Croes, C., Moens, S., Van Bastelaese, E., Vanderleyden, J. and Michiels, K. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 139:2261-2269.
- Crowley, J. F., Goldstein, I. J., Arnarp, J. and Lonngren, J. 1984. Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:524-533.
- Danilov, Y. N., and Cohen, C. M. 1989. Wheat germ agglutinin but not concanavalin A modulates protein kinase C-mediated phosphorylation of red cell skeletal proteins. *FEBS Lett.*, 257:431-434.
- Dazzo, F. B. and Truchet, G.L. 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membrane Biol.*, 73:1-16.
- De Troch, P., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., Dazzo, F. B. and Vanderleyden, J. 1992. Analysis of extracellular polysaccharides isolated from *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains. *Symbiosis*, 13:229-241.
- de Zamaroczy, M. 1995. Genetic control of nitrogen assimilation and nitrogen fixation in free living *Azospirillum brasilense*, p. 77-89. In I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, and M. de Zamaroczy (eds.), *Azospirillum VI and related microorganisms*. Vol. 37, NATO ASI Series, Springer, Berlin.
- de Zamaroczy, M. 1998. Structural homologues P_{II} and P_Z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. *Mol. Microbiol.*, 29:449-463.
- de Zamaroczy, M., Delorme, F. and Elmerich, C. 1989. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*) of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol. Gen. Genet.*, 220:88-94.
- de Zamaroczy, M., Paquelin, A. and Elmerich, C. 1993. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 175:2507-2515.
- de Zamaroczy, M., Paquelin, A., Peltre, G., Forchhammer, K. and Elmerich, C. 1996. Coexistence of two structurally similar but

- functionally different P_{II} proteins in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., 178:4143-4149.
- Del Gallo, M. and Haegi, A. 1990. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis, 9:155-161.
- Del Gallo, M., Negi, M. and Neyra, C. A. 1989. Calcofluor- and lectin binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol., 171:3504-3510.
- Del Gallo, M. and Fendrik, I. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*, p. 57-76. In Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Del Gallo, M., Neyra, C. A., Waschütza, S., Hofman, N. and Fendrik, I. 1991. First steps of the interaction between cereal and *Azospirillum*, p. 355. In Keel C., Koller B., Défago, G. (eds.), *Plant growth-promoting rhizobacteria: progress and prospects*. IOBC/WPRS Bulletin, XIV/8.
- Diaz, L. C., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J. and Kijne, J. W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Nature, 338:579-581.
- Dingler, C., Kuhla, J., Wassink, H. and Oelze, J. 1988. Levels and activities of nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* grown at different dissolved oxygen concentrations. J. Bacteriol., 170:2148-2152.
- Dobereiner, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis, 13:1-13.
- Dobereiner, J. and Day, J. M. 1975. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses, p. 39-56. In W. D. P. Stewart (ed), *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms*. Cambridge, London.
- Dobereiner, J., Reis, V. M., Paula, M. A. and Olivares, F. 1993. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants, p. 671-676. In R. Palacios, Mara, J., Newton, W. E. (eds.), *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Elmerich, C., Zimmer, W. and Vieille, C. 1991. Associative nitrogen fixing bacteria, p. 212-258. In Stacey, G., Evans, H., Burris, R. (eds.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York.
- Eskew, D. L., Focht, D. D. and Ting, I. P. 1977. Nitrogen fixation, denitrification and pleiomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. Appl. Environ. Microbiol., 34:585-592.

- Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N., Roberts, N. J., Day, R. B. and Murphy, J. B. 1999. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5856-5861.
- Fadel-Picheth, C. M. T., Souza E. M., Rigo L. U., Funayama, S., Yates, M. G. and Pedrosa, F. O. 1999. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179:281-288.
- Fages, J. 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments, p. 87-109. *In* Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Fahsold, R., Singh, M. and Klingmuller, W. 1985. Cosmid cloning of nitrogenase structural genes of *A. lipoferum*, p. 30-40. *In* W. Klingmuller (ed), *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Fallik, E., Sarig, S. and Okon Y. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*, p. 77-85. *In* Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Figurski, D. H., and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1648-1652.
- Fogher, C., Dusha, I., Barbot, P. and Elmerich, C. 1985. Heterologous hybridization of *Azospirillum* DNA to *Rhizobium nod* and *fix* genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 30:245-249.
- Fu H., and Burris, R.H. 1989. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol.*, 171:3168-3175.
- Gabius, H. J. 1991. Detection and functions of mammalian lectins- with emphasis on membrane lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1071: 1-18.
- Gafny R., Okon Y., Kapulnik, Y. and Fischer M. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil. Biol. Biochem.*, 18:69-75.
- Ganguly, C. L., Chelladurai, M. and Ganguly, P. 1985. Protein phosphorylation and activation of platelets by wheat germ agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 132:313-319.
- Garcia de Salamone, I. E. and Dobereiner, J. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils*, 21:193-196.
- Garcia de Salamone, I. E., Dobereiner, J., Urquiaga, S. and Boddey, R. M. 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain - maize

- genotype associations as evaluated by the ^{15}N isotope dilution technique. *Biol. Fert. Soils*, 23:249-256.
- Gillis, M. and Reinhold-Hurek, B. 1994. Taxonomy of *Azospirillum*. p. 1-14. *In* Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N. 1980. What should be called a lectin? *Nature*, 285:66.
- Halverson, L.J. and Stacey, G. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.*, 50:193-225.
- Hartmann, A. and Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*, p. 15-40. *In* Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Hartmann, A., Fu, H. A. and Burris, R. H. 1986. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, 165:864-870.
- Holtel, A., and Merrick, M. 1988. Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. *Mol. Gen. Genet.*, 215:134-138.
- Howard, I. K., Sage, H. J. and Horton, C. S. 1972. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 149:323-326.
- Huynh, Q. K., Hironaka, C. M., Levine, E. B., Smith, C. E., Borgmeyer, J. R. and Shah, D. M. 1992. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *J. Biol. Chem.*, 267:6635-6640
- James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.*, 65:197-209.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Henis, Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.*, 31: 881.
- Karpati, E., Kiss, P., Fendrik, I., de Zamaroczy, M. and Orosz, L. 1999. Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation. *J. Bacteriol.*, 181:3949-3955.
- Kim, J., and Rees, D. C. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*, 33:389-397.

- Klopper, J. W. 1994. Plant-growth promoting rhizobacteria, p. 137-166. In Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Kobata, A. 1992. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, 209:483-501.
- Kolberg, J., Michaelsen, T. E. and Sletten, K. 1983. Properties of a lectin purified from the seeds of *Cicer arietinum*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364:655-664.
- Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C. and Juliano, R. L. 1991. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of β_1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8392-8396.
- Ladha, J. K. and Reddy, P. M. 1995. Extension of nitrogen fixation to rice - necessity and possibilities. *Geojournal*, 35:363-372.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lakshmi, V., Rao A. S., Vijayalakshmi, K., Lakshmi-Kumari, M., Tilak, K. V. B. R. and Subba Rao, N. S. 1977. Establishment and survival of *Spirillum lipoferum*. *Proc. Natl. Acad. Sci., Sect.B.*, 86:397-404.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J and Denarie, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 344:781-784.
- Leyser, O. and Berleth, T. 1999. A molecular basis for auxin action. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10:131-137.
- Levanony, H. and Bashan, Y. 1989. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. *Curr. Microbiol.*, 18:145-149.
- Levanony, H. and Bashan, Y. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil*, 137:91-97.
- Levanony, H., Bashan, Y., Romano, B. and Klein, E. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling. *Plant Soil*, 117:207-218.

- LeVin, D., Kaplan, M. J. and Greenaway, P. J. 1972. The purification and characterization of wheat germ agglutinin. *Biochem. J.*, 129:847-856.
- Liang, Y. Y., Kaminski, P. A. and Elmerich, C. 1991. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. *Mol. Microbiol.*, 5:2735-2744.
- Lis, H., and Sharon, N. 1972. Soy-bean (*Glycine max*) agglutinin. *Methods Enzymol.*, 28:360-368.
- Lovrien, R. E. and Anderson, R. A. 1980. Stoichiometry of wheat germ agglutinin as a morphology controlling agent and as a protective agent for the human erythrocyte. *J. Cell Biol.*, 85:534-548.
- Lowry, O. H., Rosebrough, M. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Mandal, D. K. and Brewer, C.F. 1993. Lectin-glycoconjugate cross-linking interactions, p. 117-128. *In* H.J. Gabius and S.Gabius (eds.). *Lectins and glycobiology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Michiels, K., Van Gool, A., Signer, E. 1988. Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* *exoB* and *exoC* mutants. *J. Bacteriol.*, 170:5401-5404.
- Michiels, K., Vanderleyden, J. and Van Gool, A. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 8:356-368.
- Michiels, K., Verreth, C. and Vanderleyden, J. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.*, 69:705-711.
- Michiels, K., Croes, C. L. and Vanderleyden, J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 137:2241-2246.
- Michiels, K., Vanderleyden, J. and Elmerich, C. 1994. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*, p. 41-56. *In* Y. Okon (ed), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H. and Strong, F. M. 1961. A kinetin-like compound in plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 12:395-408.

- Mishkind, M. L., Palevitz, B. A. and Raikhel, N. V. 1983. Localization of wheat germ agglutinin-like lectins in various species of the *Gramineae*. *Science* 220:1290-1292.
- Murthy, M. G. and Ladha, J. K. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 4:3-7.
- Nagata, Y., and Burger, M. M. 1974. Wheat germ agglutinin: molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.*, 249:3116-3122.
- O'Hara, G. W., Davey, M. R. and Lucas, J. A. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strain under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.*, 27:871.
- Okon, Y. and Hadar, Y. 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 6:61.
- Okon, Y., Albrecht, S. L. and Burris, R. H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 127:1248-1254.
- Okon, Y., Heytler, P. G. and Hardy, R. W. F. 1983. N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:694.
- Okon, Y. and Labandera-Gonzales, C. A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 26:1591-1601.
- Okon, Y., Itzigsohn, R., Burdman, S. and Hampel, M. 1995. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*/plant association, p. 635-640. *In* Tikhonovich, I. A., Provorov, N. A., Romanov, V. I. and Newton, W. E. (eds.). *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Olasz, F., Stalder, R. and Arber, W. 1993. Formation of the tandem repeat (IS30)₂ and its role in IS30-mediated transpositional DNA rearrangements. *Mol. Gen. Genet.*, 239:177-187.
- Patriquin, D. G. and Dobereiner, J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, 24:734-747.
- Patriquin, D. G., Dobereiner, J. and Jain, D. K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.*, 29:900-915.

- Pedrosa, F. O., Teixeira, K. R. S., Machado, I. M. P., Steffens, M. B. R., Klassen, G., Benelli, E. M., Machado, H. B., Funayama, S., Rigo, L. U., Ishida, M. L., Yates, M. G. and Souza, E.M. 1997. Structural organization and regulation of *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 843-846.
- Perroud, B., Bandhari, S. K. and Elmerich, C. 1985. The *nifHDK* operon of *Azospirillum brasilense* Sp7. p. 10-19. *In* W. Klingmüller (ed.), *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. Springer-Verlag, Berlin.
- Pusztai, A. 1991. Plant lectins, Cambridge University Press, Cambridge.
- Pusztai, A., Croy, R., Grant, G. and Stewart, J. C. 1983. Seed lectins: distribution, location and biological role, p. 53-82. *In* Dassuani, J., Mosse, J., Vaughan, J. (eds.). Seed Proteins. Academic Press, New York.
- Rao, V., Jena, P. K. and Adhya, T. K. 1987. Inoculation of rice with nitrogen-fixing bacteria. Problems and perspectives. *Biol. Fertil. Soils*, 4:21.
- Reinhold, B. and Hurek, T. 1988. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the Kallar grass association. *Plant Soil*, 110:259-268.
- Reinhold, B., Hurek, T. and Fendrik, I. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* sp. *J. Bacteriol.*, 162:190-195.
- Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E. G. and Fendrik, I. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:520-526.
- Rennie, R. J. 1981. Potential use of induced mutations to improve symbioses of crop plants with N₂-fixing bacteria, p. 293-321. *In* Proceedings of Symposium Induced mutations - a tool in plant research. IAEA, FAO, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Rennie, R. J., de Freitas, J. R., Ruschel, A. P. and Vose, P. B. 1983. ¹⁵N isotope dilution to quantify dinitrogen (N₂) fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. *Can. J. Bot.*, 61:1667-1671.
- Rethati, B., Dallmann, K., Simon, K. I., Balint, A., Szajani, B., Orosz, L. and Karpati, E. 2000. Characterization of Hungarian rice cultivars in nitrogen fixing associations with bacteria. *Cereal Res. Comm.* (in press)
- Roberts, N. J., Brigham, J., Wu, B., Murphy, J. B., Volpin, H., Phillips, D. A. and Etzler, M. E. 1999. A Nod factor-binding lectin is a member

- of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. *Mol. Gen. Genet.*, 262:261-267.
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C. and Prome, J. C. 1991. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.*, 266:10933-10940.
- Sadasivan, L. and Neyra, C. A. 1985. Flocculation of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.*, 163:716-723.
- Sadasivan, L. and Neyra, C. A. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.*, 169:1670-1677.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- San José, E., Benguria, A. and Villalobo, A. 1990. A novel adenylation process in liver plasma membrane-bound proteins. *J. Biol. Chem.*, 265:20653-20661.
- Santer, R., Leung, Y. K., Alliet, P., Lebenthal, E. and Lee, P. C. 1990. The role of carbohydrate moieties of cholecystokinin receptors in cholecystokinin octapeptide binding: alteration of binding data by specific lectins. *Biochem. Biophys. Acta*, 23:78-83.
- Sarig S., Blum A. and Okon Y. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci. Camb.*, 110:271-274.
- Schank, S. C., Smith, R. L., Weiser, G. C., Zuberer, D. A., Bouton, J. H., Quesenberry, K. H., Tyler, M. E., Miliam, J. R. and Littell, R. C. 1979. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil Biol. Biochem.*, 11:287-295.
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekart, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. and Peumans, W. J. 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(2→6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.*, 262:1596-1601.

- Shrestha, R. K. and Ladha, J. K. 1996. Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen ^{15}N dilution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 60:1815-1821.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, 1:784-791.
- Skvortsov, I. M. and Ignatov, V. V. 1998. Extracellular polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiol. Lett.*, 165:223-229.
- Smith, R. L., Schank, S. C., Milam, J. R. and Baltensperger, A. A. 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N_2 -fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:1331.
- Souza, E. M., Funayama, S., Rigo, L. U., Yates, M. G. and Pedrosa, F. O. 1991. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.*, 137:1511-1522.
- Spaink, H. P., Sheeley, D. M., Van Brussel, A. A. N., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. and Lugtenberg, B. J. J. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipopolysaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 354:125-130.
- Stein, T., Ueckert, J. and Fendrik, I. 1995. Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of Kallar grass using alginate-coated seeds in mixed inoculation, p. 239-243. *In* I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, and M. de Zamaroczy (eds.), *Azospirillum VI and related microorganisms*. Vol. 37, NATO ASI Series, Springer, Berlin.
- Sukiman, H. I. and New, P. B. 1990. Relationship between root colonization and initial adsorption of *Azospirillum* to plant roots. *Microb. Ecol.*, 20:65-74.
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R. and Dobereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967-980.
- Tien, T. M., Gaskins, H. M. and Hubbel, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the

- growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol., 37:1016-1024.
- Tilak, K. V. and Subba Rao, N. S. 1987. Association of *Azospirillum brasilense* with pearl millet (*Pennisetum americanum*). Biol. Fertil. Soils, 4:97-102.
- Tsuchiya, E., Hiraga, K., Fukui, S. and Miyakawa, T. 1989. Identification of a wheat germ agglutinin-sensitive ATPase in yeast nuclei. FEBS Lett., 250:285-288.
- Ueckert, J., Stephan, M., Dobereiner, J., Niemann, E. G., Fendrik, I. 1990. Induction of cyst-formation by entrapment of *Azospirillum* spp. in Ca²⁺-alginate beads, p. 595. In Gresshoff, A., Roth, M. A., Stacey, G., Newton, W. E. (eds.). Nitrogen fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, New York, London.
- Umali-Garcia, M., Hubbel, D. H., Gaskins, M. H. and Dazzo, F. B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol., 39:219-226.
- Urquiaga, S., Cruz, K. H. S. and Boddey, R. M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. Soil Sci. Soc. Am., 56:105-114.
- Vande Broek, A. and Vanderleyden, J. 1995. Review: Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. Crit. Rev. Plant Sci., 14:445-466.
- Vande Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A. and Vanderleyden, J. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. Mol. Plant-Microbe Interact., 6:592-600.
- Van Rhijn, P., Goldberg, R., B. and Hirsch, A., M. 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. Plant Cell, 10:1233-1249.
- Vieille, C. and Elmerich, C. 1990. Characterization of two *Azospirillum brasilense* Sp7 plasmid genes homologues to *Rhizobium meliloti* *nodPQ*. Plant Microbe Interact., 3:389-400.
- Von Bulov, J. F. W. and Dobereiner, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:2389-2393.
- Wang, W. C. and Cummings, R. D. 1988. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing

- terminal sialic acid-linked α -2,3 to penultimate galactose residues. *J. Biol. Chem.*, 263:4576-4585.
- Westby, C. A., Enderlin, C. S., Steinberg, N. A., Joseph, C. M. and Meeks, J. C. 1987. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. *J. Bacteriol.*, 169:4211-4214.
- Whallon, J. H., Acker, G. F. and El-Khawas, H. 1985. Electron microscopy of young wheat roots inoculated with *Azospirillum*, p. 222-229. *In* W. Klingmuller (ed), *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology. Springer-Verlag, Berlin.
- Wilkins, T. A. and Raikhel, N. V. 1989. Expression of rice lectin is governed by two temporally and spatially regulated mRNAs in developing embryos. *Plant Cell*, 1:541-549.
- Wood, P. J. and Fulcher, R. G. 1978. Interaction of some dyes with cereal β -glucans. *Cereal Chem.*, 55:952-966.
- Wright, C. S. 1980. Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. *J. Mol. Biol.*, 141:267-291.
- Wright, C. S. 1984. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J. Mol. Biol.*, 178:91-104.
- Wright, H. T., Sandrasegaram, G. and Wright, C. S. 1991. Evolution of a family of *N*-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. *J. Mol. Evol.*, 33:283-294.
- Wright, C.S. 1992. Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. *J. Biol. Chem.*, 267:14345-14352.
- Wright, C. S. and Jaeger, J. 1993. Crystallographic refinement and structure analysis of the complex of wheat germ agglutinin with a bivalent sialoglycopeptide from glycophorin A. *J. Mol. Biol.*, 232:620-638.
- Wu, P., Zhang, G., Ladha, J. K., McCouch, S. R. and Huang, N. 1995. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N_2 fixation in the rhizosphere of irrigated rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 91:1177-1183.

- Yagoda-Shagam, J., Barton, L. L., Reed, W. P. and Chiovetti, R. 1988. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum brasilense* by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1831-1837.
- Yoshida, K. I., Honda, M., Arai, K., Hosoya, Y., Moriguchi, H., Sumi, S., Ueda, Y. and Kitahara, S. 1997. Serial lectin affinity chromatography with concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphate in human prostate carcinoma. *J. Chromatogr.* 695:439-443.
- Zhang, Y., Burris, R. H., Ludden, P. W. and Roberts, G. P. 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152:195-204.

Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm témavezetőimnek, Dr. Orosz Lászlónak és Dr. Debreczeni Bélánénak, hogy kutatómunkámat figyelemmel kísérték, irányították és segítettek, és lehetővé tették a dolgozat elkészítését.

Külön köszönöm Dr. Fendrik István (Universitat Hannover) és Dr. Zamaróczy Miklós (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris) professzoroknak a kutatásaim szakmai és pénzügyi támogatását, valamint baráti támogatásukat, mellyel nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy a dolgozat elkészüljön.

Köszönet a Biotechnológia és Molekuláris Genetika Tanszék egész közösségének a mindennapi munkámban nyújtott segítségükért.