

# VIZSGÁLATOK TALAJ-MIKROSZERVEZETEK TAXONÓMIAI JELLEMZÉSÉRE GÉL-ELEKTROFORÉZISSSEL\*

PÉCHYNE KÖVES KRISZTINA

SZENDE KÁLMÁN

a biológiai tudományok kandidátusa

MTA Talajtani Kutató Intézete, Budapest

A *Rhizobium* genus taxonómiai osztályozása elsősorban a fertőzhetőségi csoportosításon alapul. A 16 lehető fajból 6 speciést emelnek ki általában, amit más szerzők megtoldanak, így ALLEN—ALLEN (1950) 22-re emelik a fajok számát.

GRAHAM (1964) numerikus taxonómiai módszerrel végzett vizsgálatok alapján javasolta, hogy csak 3 *Rhizobium* species legyen: a *Rh. meliloti* és a *Rh. leguminosarum*; ez utóbbihoz tartozna a *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii* és *Rh. phaseoli* csoport. Ezenfelül a harmadik, a lassan nöövő, ún. *Phytomyxa japonicum* csoport lenne, a *Rh. lupini* és *Rh. japonicum* fajokkal.

T MANNETJE (1967) ugyancsak foglalkozott a *Rhizobium*ok és a genushoz közel álló más baktériumok taxonómiai kérdéseivel. A vizsgálati eredmények alapján arra következtetett, hogy — többek között — az *Agrobacterium* sokkal szorosabban rokon a gyorsan nöövő *Rhizobium*okkal, mint a lassan nöövővel, továbbá, hogy a lassan és gyorsan nöövő *Rhizobium*ok rokonsági foka nagyobb, mint azoknak a Beijerinckiaival és a *Chromobacterium*okkal.

Ezeknek a taxonómiai vizsgálatoknak az eredményei azt mutatták, hogy a *Rhizobium* genus helyzete, és azon belül az egyes fajok elkülönítése ma még meglehetősen tisztázatlan.

A taxonómiai kapcsolatokat általában az ún. fenetikai kapcsolatok alapján határozzák meg. A fenetikai kapcsolatokat a vizsgált szervezetek mai sajátosságai alapján rendszerezik. Ezek eltérnek a filogenetikai kapcsolatoktól, melyek megállapítása baktériumoknál nehézségekbe ütközne.

Fenetikai kapcsolatok meghatározására ún. numerikus módszereket alkalmaznak elsősorban, ezeket nagyszámú egyedi megfigyelés és értékelés alapján végzik. Ilyen megfigyelések kiterjednek a morfológiai, biokémiai, szerológiai, genetikai és ökológiai sajátosságokra. A számos jelleg együttes vizsgálata jól megalapozza az ilyen taxonómiai jellemzéseket, de nem elhanyagolandó a tisztán genetikai kapcsolatok vizsgálata sem, mely végső soron a DNS szekvenciák homológiáján alapul és evolúciós következtetésekre is lehetőséget ad.

\* Előadás a Talajbiológiai Tudományos Ülésen. Debrecen 1973. szeptember 4.

A baktériumok osztályozása tehát fenetikai és genetikai rokonsági fokok alapján történhet. Ez szemlélet kérdése. Így RAVIN [cit. Szende (1967)], mint baktérium-genetikus 3 kategóriát különböztet meg a faj meghatározásában: az ún. *nomen speciest*, amelyet a biner kombináció határoz meg, a *taxospeciest*, melyet fenetikai vizsgálatok alapján, a hasonlatosság alapján határoznak meg, és a *genospeciest*, amelyen belül a rekombinálódás lehetséges, tehát a genetikai homológia igen nagy.

Mi a genetikai homológia és mit jelentenek a genetikai kapcsolatok?

Elsősorban a gének átvitelének lehetőségein és a kapott rekombinánsok elemzésén alapulnak az ilyen vizsgálatok. Baktériumoknál a génátvitelnek közül ismeretesek a genetikai transzformálás, a transzdukción, a konjugáción és a plazmid transzfer. Természetesen az ilyen génátviteli lehetőségek csak az első lépést jelentik a taxonómiai rokonság megállapításában, mivel a gén átvitele után egy stabil gén integrálódásnak is be kell következnie, ezenfelül a beépült gén reduplikálódásának és expressziójának is. A fajok közötti ilyen jellegű génátviteli lehetőségek sok esetben már igen kismértékű genetikai megváltozás után is megszűnnek. Általában a fajok közti átviteli akadályok elég nagyok és számos tényező befolyásolhatja azokat.

A genetikai kapcsolat megállapítására használhatóbb módszerek egyrészt az AT/GC arány meghatározása, a nukleinsavak homológiájának megállapítása párosítással, továbbá a géntermékek — fehérjék — szekvenciájának vizsgálata. A nukleinsavak homológiájának a G + C arány alapján történő meghatározását DE LEY (1965) a Rhizobiumok taxonómiai vizsgálatában már felhasználta. Később JONES és SNEATH (1970) a genetikai rokonság megállapításában összegezte ebben a vonatkozásban a Rhizobium genus helyzetét. Ennek alapján a Rhizobiumok G + C tartalma 59—66%. Általában transzformálható Pseudomonással, a Rh. leguminosarum transzformálható Agrobacterium tumefacienssel, közös fágjaik vannak, az Agrobacterium radiobacterrel és feltehetően az Arthrobacter globiformissal. Ez utóbbiak G + C aránya 60—64%, míg az említett Agrobacterium csoporté 58—66%.

DE LEY gyorsan növekvő, peritrich, alacsony G + C tartalmú csoportot különböztet meg, melybe a Rh. leguminosarum és Rh. meliloti speciest sorolja. A két faj között a disztinkción azonban már nehéz, mivel a Rh. leguminosarum G + C tartalma 59,1—63,1% között van, míg a Rh. melilotié 62,4%. A másik csoport DE LEY szerint a szubpolárisan ostoros, magas G + C tartalmú csoport. Ide tartozik a Graham-féle Phytomyxa japonicum csoport, amelybe a Rh. japonicum és Rh. lupini speciestek tartoznának. G + C tartalmuk 62,8—65,5%.

Mivel a géntermékek, tehát a fehérjeszekvenciák vizsgálata rendkívül nagy technikai felkészültséget igényel, a genetikai homológia megállapítása ezen az alapon nehéz. Eddig mindössze két baktériumfehérjére, a ferredoxinra és a rubredoxinra végeztek el.

Van azonban egy lehetőség a fehérjék gyors jellemzésére a gél-elektroforézis segítségével. A gél-elektroforézis rendkívül érzékeny és már egyetlen mutációs megváltozás is — ami a fehérjék aminosav-sorrendjében egy aminosav szubsztitúciót eredményez — kimutatható. Kísérleteinkben gél-elektroforézis segítségével egyrészt a *Rhizobium*ok ún. összes fehérjemintázatát elemeztük, másrészt vizsgáltuk néhány dehidrogenázuk mintázatát. Ezek közül elsősorban az almasav dehidrogenázokkal kapott eredményekről számolunk be. Később részletesen foglalkozunk majd más dehidrogenázokkal is: így a glutaminsav-, alkohol-, tejsav-, glukóz-6-foszfát-, alfa-glicerofoszfát-dehidrogenázokkal.

A vizsgálatokat több taxospeciesbe sorolt baktériumfajjal végeztük. Ezek több helyről, elsősorban Európából származnak. Célunk ezzel az volt, hogy a különböző helyről begyűjtött fajok összehasonlításával az esetleges geográfiai eltéréseket is megállapíthassuk (I. táblázat).

### I. táblázat

#### *Rhizobium* törzsek származási helyei

#### 1. *Rhizobium leguminosarum*

- D 54 Csehszlovákia
- 93 Csehszlovákia
- 116 Románia
- 227 Szovjetunió
- 374 Szovjetunió
- 389 Német Demokratikus Közt.

#### 2. *Rhizobium meliloti*

- D 3 Szovjetunió
- 16 Csehszlovákia
- 113 Románia
- 135 ?
- 204 Svájc
- 263 Argentína
- 41—222—21 Magyarország

#### 3. *Rhizobium trifolii*

- D 112 Románia
- 182 Jugoszlávia
- 203 Svájc
- 282 ?
- 377 Szovjetunió

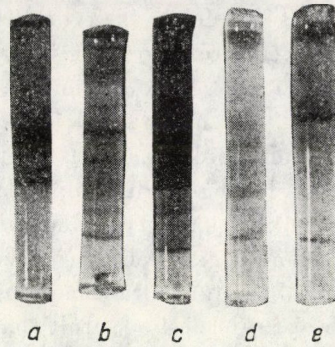
#### 4. *Rhizobium phaseoli*

- D 475 Csehszlovákia

#### 5. *Rhizobium japonicum*

- D 40 Románia
- 104 Jugoszlávia
- 130 Lengyelország
- 225 Szovjetunió
- 337 Argentína
- 387 Német Demokratikus Közt.

Az öt faj tehát 26 különböző helyről származott. A vizsgált törzsek egyes telepekből eredő klón tenyészetek voltak, a mintán belüli esetleges szóródás elkerülése végett. A tenyésztést állandó feltételek között végeztük. A sejtek feltárását és a fehérjék izolálását lysozymes és detergenssel történő kezeléssel hajtottuk végre. Az elektroforézis akrilamid gélen történt és a festés után a fehérjemintázatot denzitométerrel kvantitatív módon értékeltük. A fehérjesávok száma általában 20 körül volt, ebből 10 jellegzetes fehérjét választottunk ki és ezek R<sub>f</sub> értékét meghatároztuk. Az egyes fehérjék eredete allélesnek tekinthető és így tulajdonképpen 10 különféle allélt használtunk fel a rokonsági fok megállapítására. Természetesen nagyobb számú minta és több alléles fehérje felhasználása a vizsgálatokban a módszer értékét tovább fokozhatja és akár numerikus elemzés is végezhető a kapott eredmények alapján.

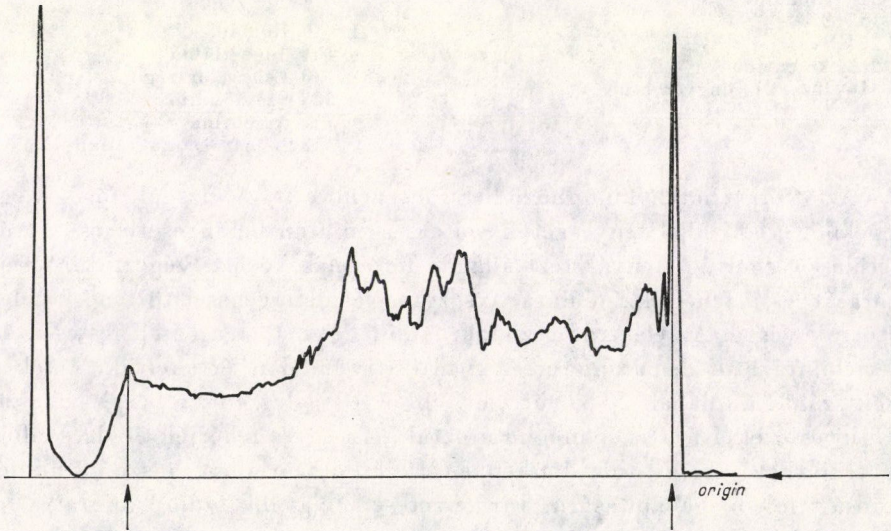


1. ábra. Egyes fajokra jellemző fehérjemintázat 5 gélen a = Rh. leguminosarum, b = Rh. meliloti, c = Rh. trifolii, d = Rh. phaseoli, e = Rh. japonicum

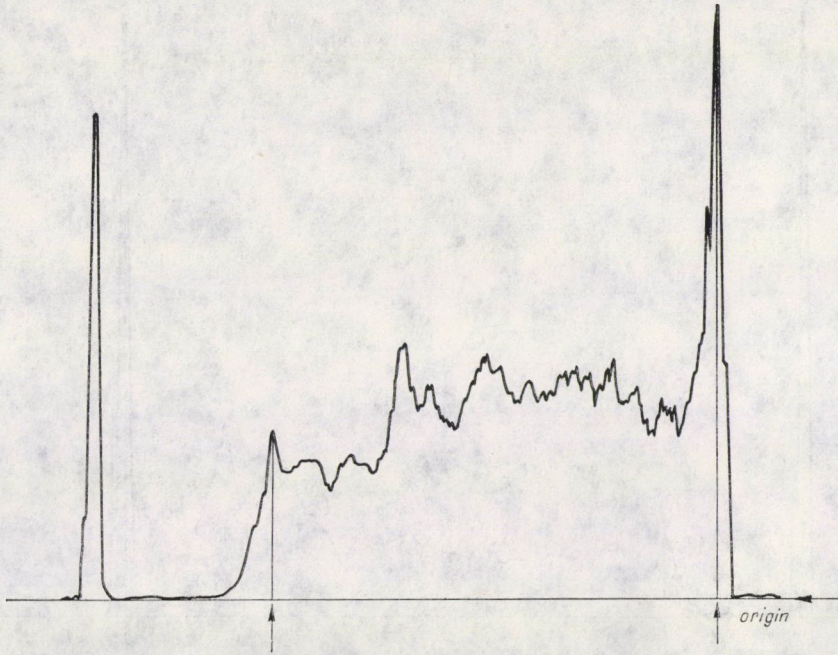
Az 1. ábrán bemutatjuk az egyes fajokra jellemző fehérjemintázatot 5 gélen.

Az egyes fehérjemintázatokról készült denzitométeres görbéket a 2., 3., 4., 5., 6. ábra ismerteti.

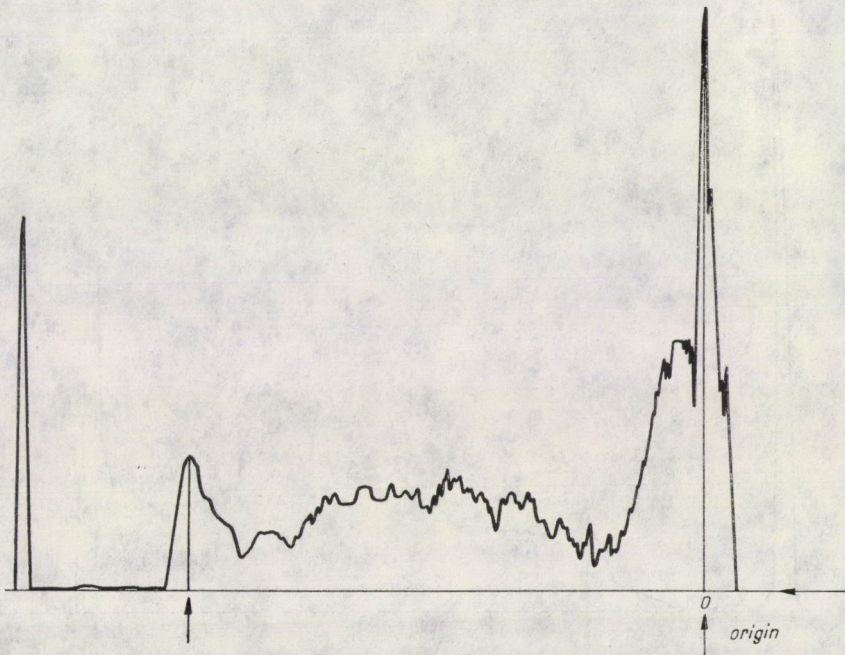
Denzitométeres görbék alapján számítottuk ki azokat az azonosságokat és különbözőségeket, amelyek az egyes vizsgált fehérjék Rf értékeinek azonossága és különbözősége alapján megállapíthatók voltak. Ha az Rf érték  $\pm 2\%$  eltérést mutatott, úgy ezeket a fehérjéket már különböző gének termékeinek fogtuk fel. Ezen az alapon BAPTIST et al. (1969) után 0-24, 25-34 és 35



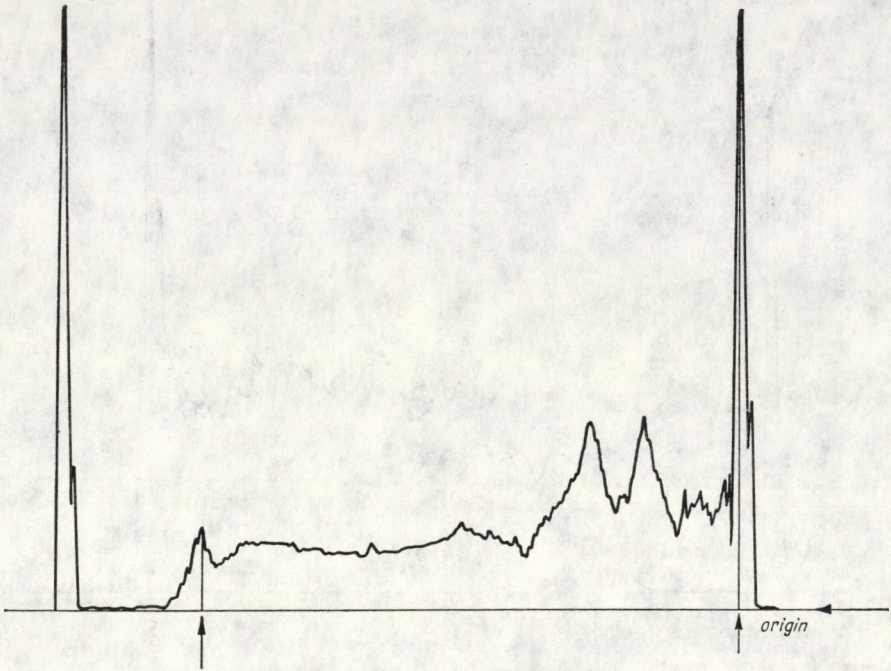
2. ábra. Rh. leguminosarum összes fehérje zimogramja



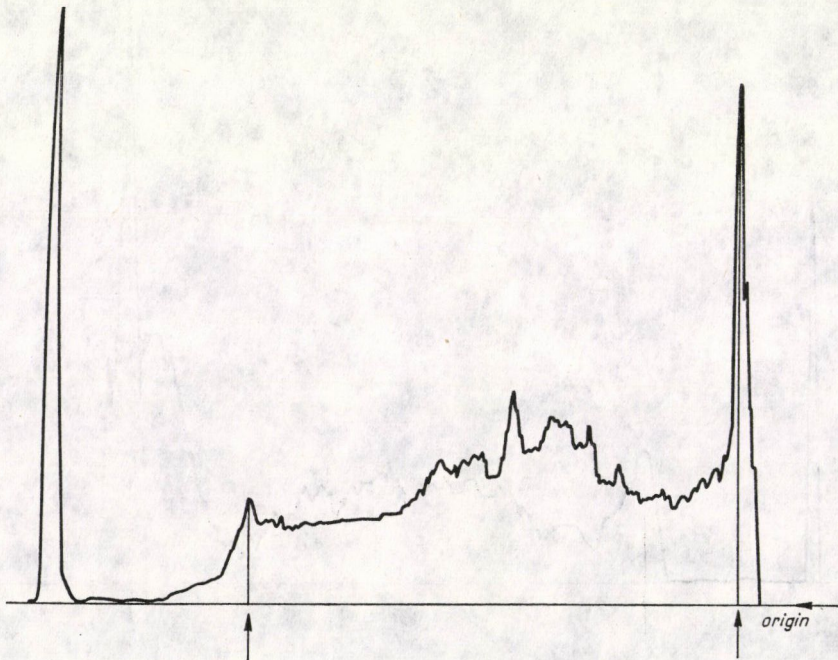
3. ábra. Rh. trifolii összes fehérje zimogramja



4. ábra. Rh. phaseoli összes fehérje zimogramja



5. ábra. Rh. meliloti összes fehérje zimogramja



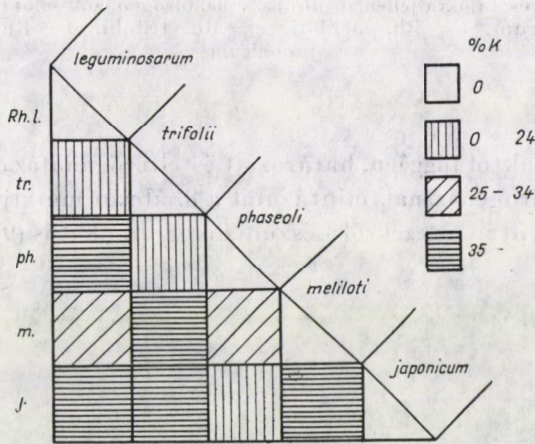
6. ábra. Rh. japonicum összes fehérje zimogramja

fölötti, tehát három különbözőségi csoportba soroltuk az adatokat a következő egyenlet alapján

$$K\% = \frac{NK}{(NK) + (NH)} \cdot 100$$

ahol K a különbözőséget, H az azonosságot, N a megfigyelések számát jelenti (7. ábra).

Megfigyelhető, hogy az eltérések jól fedik a fenetikai kapcsolatok alapján kialakult genuson belüli rokonsági mértékeket. Esetünkben kivétel talán a

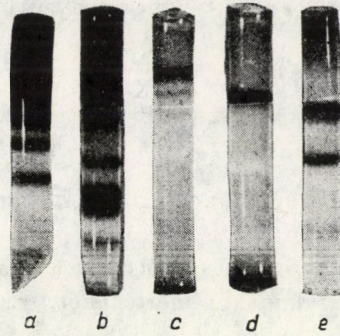


7. ábra. Különbözőségi mátrix

Rh. phaseoli. Ez annak tulajdonítható, hogy csupán egyetlen származási helyről eredő mintánk volt. A különbözőség %-a alapján a sorrend: leguminosarum, trifolii, phaseoli, meliloti, japonicum.

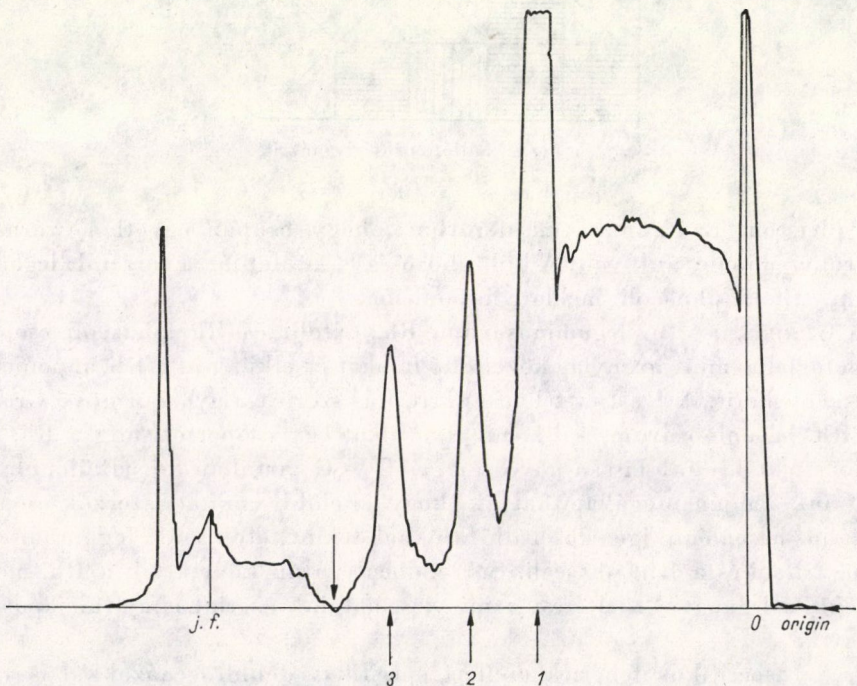
GRAHAM a Rh. leguminosarum, Rh. trifolii és Rh. phaseoli csoportot egybefoglalja, mint aránylag közel álló fajokat és elkülöníti a Rh. japonicumot és Rh. melilotit. A De Ley-féle csoportosítás szerint a gyorsan növekvő Graham-féle Rh. leguminosarum és Rh. meliloti alkot egy csoportot, míg a Rh. japonicum ezektől, mint lassan növekvő, magas G + C tartalmú faj, elkülönül. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy az előbb említett szerzők csoportosításához hasonlóan, igen közel állófajoknak tekinthetők a Rh. leguminosarum, a Rh. trifolii és a Rh. phaseoli. Sorrendben ezután következik a Rh. meliloti és végül a legnagyobb eltérést a mi vizsgálataink szerint is a Rh. japonicum mutatta.

Az aspecifikus fehérjék mellett specifikus dehidrogenázokkal is végeztünk vizsgálatokat. Eddig a legjobb eredményeket almasav dehidrogenázal



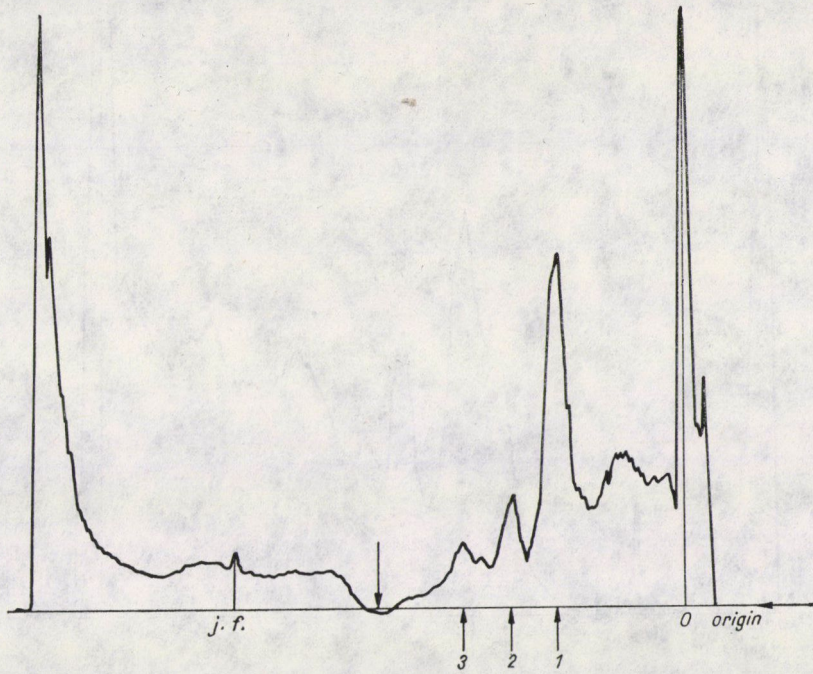
8. ábra. Egyes fajokra jellemző almasav dehidrogenázok mintázata 5 gélen  
 a = Rh. leguminosarum, b = Rh. meliloti, c = Rh. trifolii, d = Rh. phaseoli, e = Rh. japonicum

kaptuk. Ez, a fajktól függően, határozott és eltérő mintázatot mutat. Az öt faj almasav dehidrogenázának mintázatát a 8. ábrán mutatjuk be, továbbá a gélek bemutatása után az ezekről készült zimogramokat is (9., 10., 11., 12., 13. és 14. ábra).

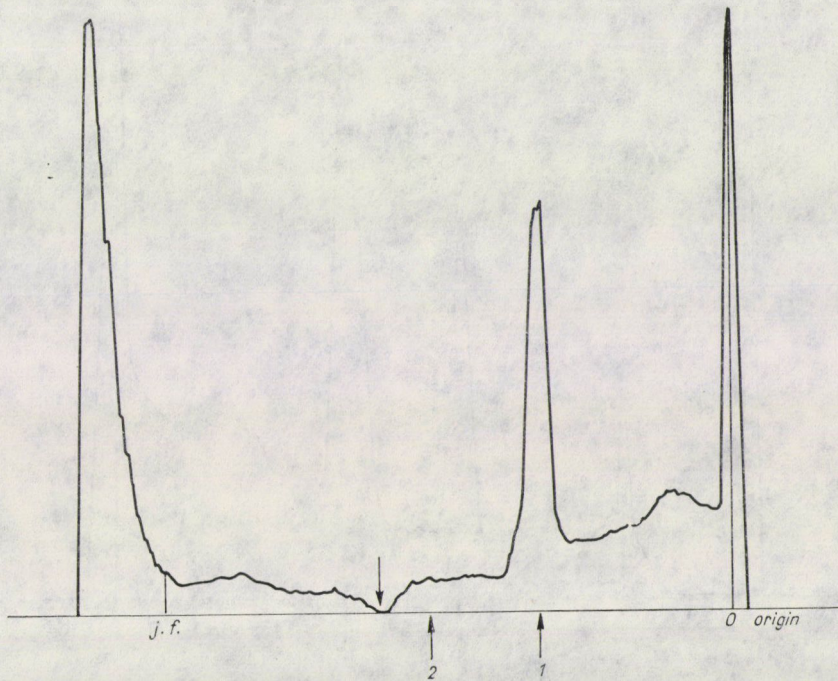


9. ábra. Rh. leguminosarum almasav dehidrogenáz és tetrazolium oxidáz zimogramja

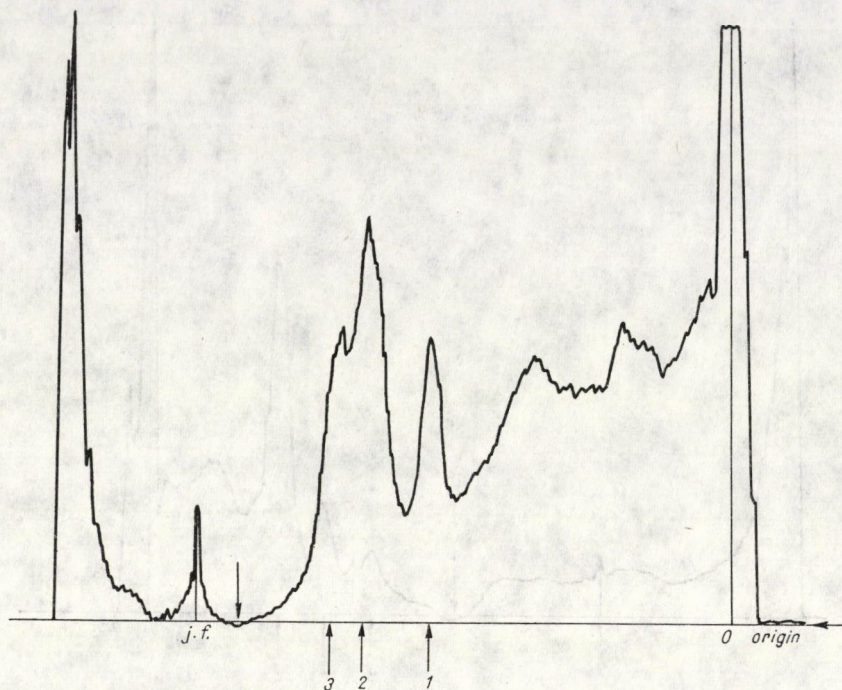




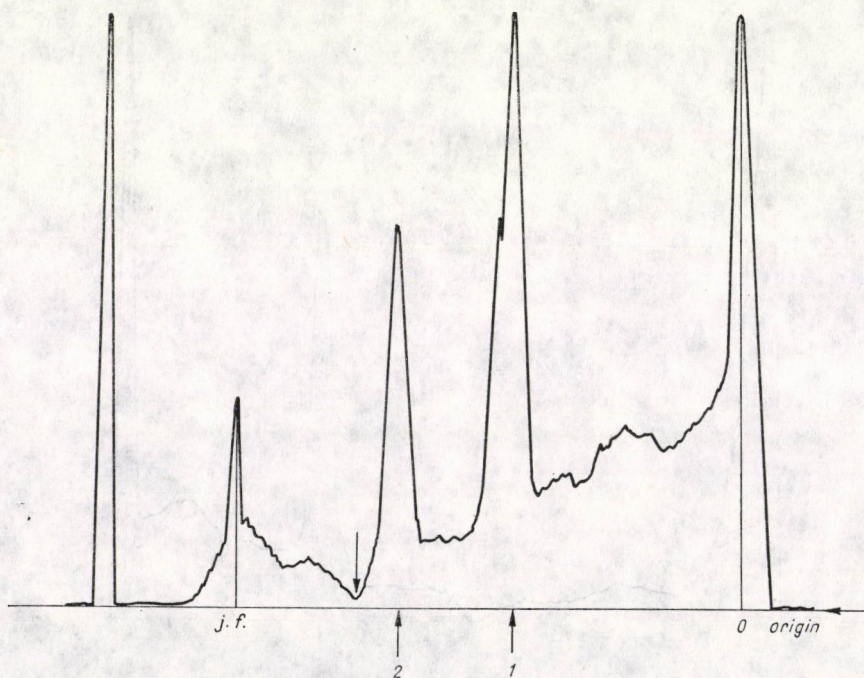
10. ábra. Rh. trifolii almasav dehidrogenáz és tetrazoliumoxidáz zimogramja



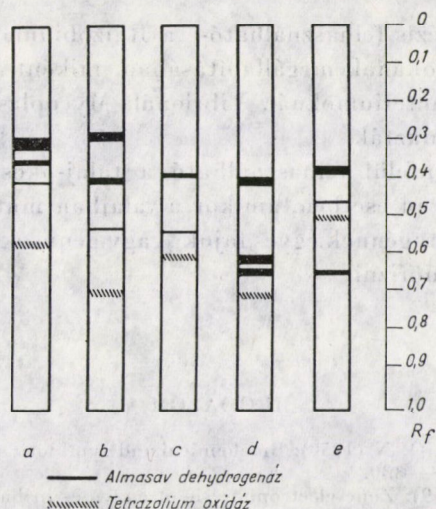
11. ábra. Rh. phaseoli almasav dehidrogenáz és tetrazoliumoxidáz zimogramja



12. ábra. Rh. meliloti almasav dehidrogenáz és tetrazoliumoxidáz zimogramja



13. ábra. Rh. japonicum almasav dehidrogenáz és tetrazoliumoxidáz zimogramja



14. ábra. Almasavdehidrogenáz és tetrazoliumoxidáz izoenzimek diagramja  
 a = *Rh. trifolii*, b = *Rh. leguminosarum*, c = *Rh. phaseoli*, d = *Rh. meliloti*, e = *Rh. japonicum*

A kapott zimogramok alapján megállapítható, hogy az egyes fajok almasav dehidrogenázainak, ill. alegységeinek száma 3. Kivételt képez a *Rh. phaseoli*, melynél kettőt mutattunk ki. Az egyes egységek mozgási sebessége azonban a fajra nézve jellemző. Így a *Rh. meliloti*-nál a három alegység általában a leggyorsabban mozgó, míg a trifoliinál a leglassúbb.

Kimutatható ezenkívül még egy tetrazoliumoxidáz is, melynek mozgási sebessége fajonként ugyancsak eltérő. A kapott elhelyezkedéseket a geográfiai eredet, tehát a fajon belüli változatosság nem befolyásolta lényegesen, és így taxonómiai jellemzésre jól felhasználhatók.

### Összefoglalás

1. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a gél-elektroforézis felhasználható a *Rh.* genuson belüli és a kapcsolt genusok közötti *genetikai* rokonság vizsgálatában.

2. Megállapítható továbbá, hogy az aránylag kisszámú minta alapján kapott genetikai kapcsolat mind a fehérjék, mind pedig a dehidrogenázok esetében a fenetikai kapcsolatok révén kialakított csoportokkal jól meg-egyezik.

Nem kívánunk az eddig kialakult taxonómiai csoportokon változtatni, vagy azokon javítani, csupán módszertani vizsgálatokat végeztünk arra nézve,

hogy a gél-elektroforézis felhasználható-e a Rhizobiumok és a rokon genusok genetikai rokonsági fokának megállapításában, miként azt más baktériumoknál, így pl. Enterobacteriumoknál, Vibrionál, Mycoplasmánál és Mycobacteriumoknál már alkalmazták.

A módszer ezenfelül felhasználható a talaj-ökoszisztémák populációs vizsgálatában: pl. olyan esetben, amikor a talajban mutagén peszticidek halmozódnak fel és a mutagénnek egyes fajok vagy genusok gén-pooljára kifejtett hatását kívánják ellenőrizni.

#### IRODALOM

- ALLEN, E. K. and ALLEN, O. N. (1950): Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. *Bact. Rev.* **14**, 273—330.
- BAPTIST, J. N. et al. (1969): Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. *J. Bacteriology* **99**, 180—188.
- DE LEY, I. and RASSEL, A. (1965): DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. *J. gen. Microbiol.* **41**, 85—91.
- GRAHAM, P. H. (1964): The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. gen. Microbiol.* **35**, 511—517.
- JONES, D. and SNEATH, P. H. A. (1970): Genetic transfer and bacterial taxonomy. *Bacteriol. Rev.* **34**, 40—81.
- SZENDE K. (1967): Baktérium hibridálások és a DNS evolúciójának kérdése. *Agrártud. Közl.* **26**, 131—140.
- \*T MANNETJE, L. (1967): A reexamination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. *Ant. van Leeuwenhoek* **33**, 477—491.