

Institut für Botanik und Mikrobiologie

KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH

des Landes Nordrhein-Westfalen - e. V.

Untersuchungen zur genetischen
Transformation zwischen *Agrobacterium*
tumefaciens und *Rhizobium spec*

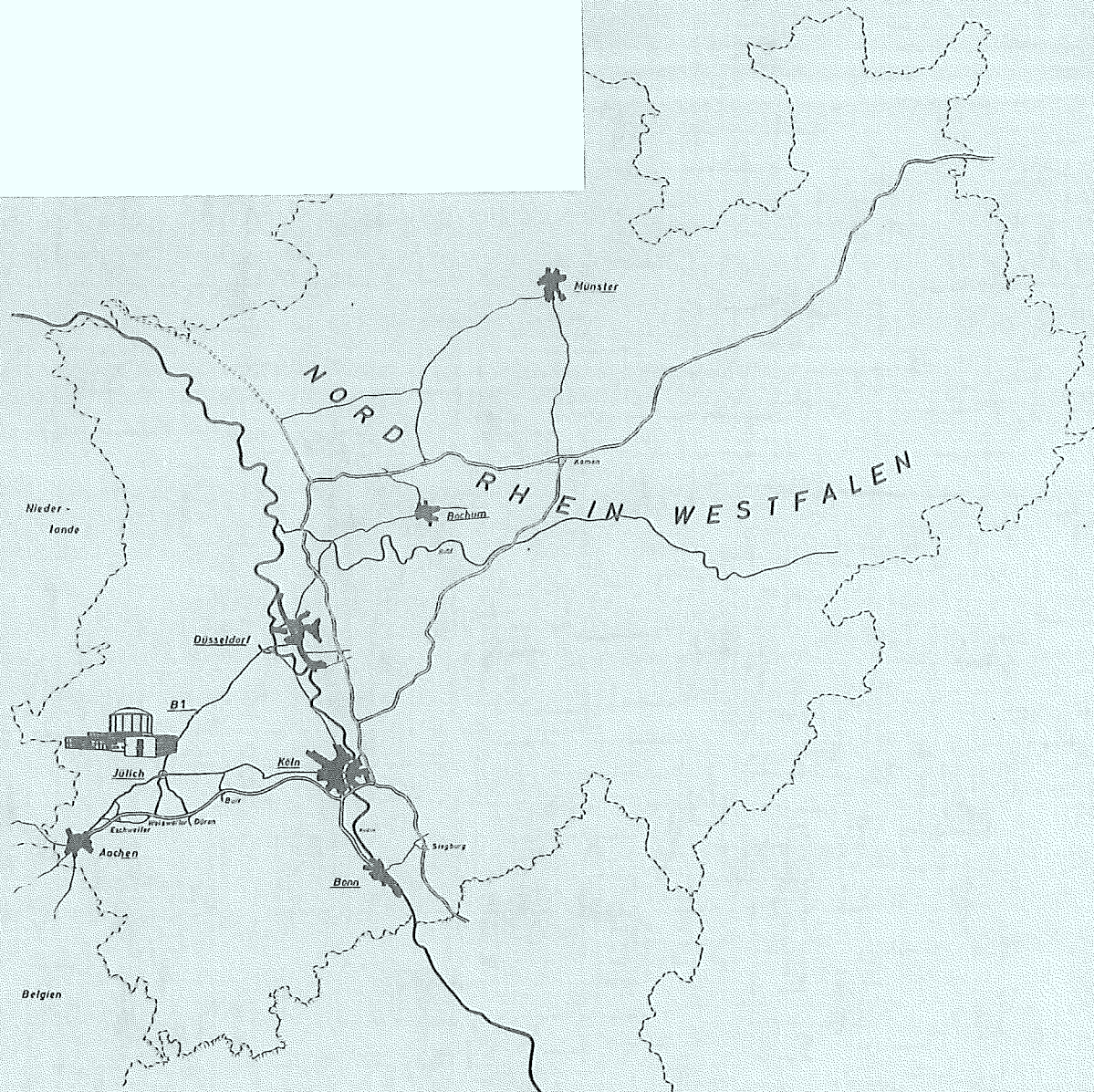
von

Hartmut Kern

Jül - 416 - BO

September 1966

Als Manuskript gedruckt



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 416

Institut für Botanik und Mikrobiologie Jül - 416 - BO

Dok.: Plant Tumors
Bacteria - Genetic Transformation
Bacteria - Taxonomy

DK: 632.35 · 576.851.155

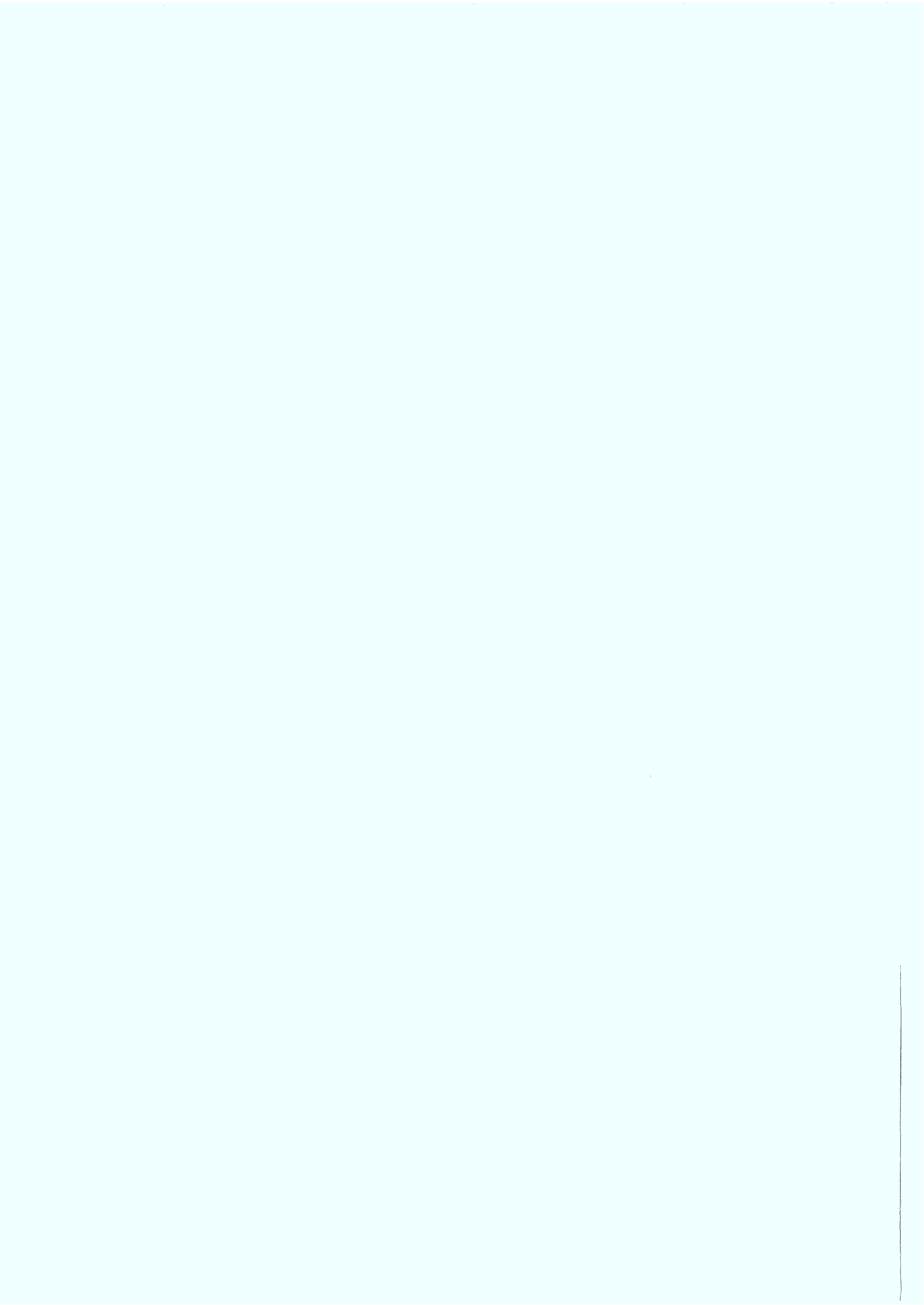
Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich,
Jülich, Bundesrepublik Deutschland

Untersuchungen zur genetischen
Transformation zwischen *Agrobacterium*
tumefaciens und *Rhizobium spec*

von

Hartmut Kern

Die Arbeit wurde als Habilitationsschrift von der Fakultät für Gartenbau
und Landeskultur der Technischen Hochschule Hannover angenommen



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
II. <u>Das Wesen der genetischen Transformation</u>	7
III. <u>Analyse einer genetischen Transformation zwischen Agrobacterium tumefaciens und Rhizobium leguminosarum</u>	15
A. <u>Durchführung einer Transformation</u>	
1. Isolierung der Donator-DNA	17
2. Charakterisierung der DNA	19
3. Transformationsansatz und Selektion virulenter Transformanten	32
4. Nachweis von Tumoreigenschaften	38
5. Bildung von Wurzelknöllchen	47
B. <u>Vergleichende morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen an den Partnern der Transformation</u>	
1. Morphologische Charakterisierung	62
2. Physiologische Eigenschaften	66
3. Abbau von Lactose	69
4. Antibiotica-Resistenz	74
5. Serologie	77
6. Strahlenresistenz als genetisches Merkmal	80

C.	<u>Untersuchungen der DNA aus Donator, Acceptor und Transformant</u>	
1.	Physikalisch-chemische Charakterisierung der DNA-Präparate	90
2.	Bestimmung der Basenzusammensetzung	
a)	papierchromatographische Untersuchungen an Säurehydrolysaten	94
b)	spektroskopische Bestimmung an säuredenaturierter DNA	96
c)	thermische Denaturierung (T_m -Punkt)	98
3.	Untersuchungen an Apyrimidinsäuren	101
4.	Nachweis homologer Basensequenzen	108
IV.	<u>Bestimmung der Transformationsrate</u>	116
V.	<u>DNA-Hybridisierung als Methode zum Nachweis genetischer und taxonomischer Beziehungen</u>	121
VI.	<u>Diskussion</u>	130
VII.	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	138
VIII.	<u>Verzeichnis der benutzten Abkürzungen</u>	142
IX.	<u>Literaturverzeichnis</u>	144

I. Einleitung und Problemstellung

Zum Verwandtschaftskreis der Rhizobiaceae (BERGEY, 1957) gehören zwei biologisch sehr interessante Bakteriengattungen, nämlich *Rhizobium* und *Agrobacterium*. In der Gattung *Rhizobium* werden die sog. Knöllchenbakterien, die in die Wurzeln verschiedener Leguminosen eindringen und dabei die Wirtspflanze zur Bildung der bekannten Wurzelknöllchen veranlassen können, zusammengefaßt. In vielen Fällen besteht zwischen den eingedrungenen Bakterien und der befallenen Pflanze zeitweise ein symbiontisches Gleichgewicht, ein Allelo-Parasitismus (SCHAEDE 1962). Die Pflanzen erlangen so mit Hilfe der Bakterien die Fähigkeit zur Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes (zusammenfassende Darstellungen z.B. ALLEN und ALLEN 1950; VIRTANEN 1947; NUTMAN 1956; SCHAEDE 1962; SCHWARTZ 1959; THIMANN 1964, S. 364 ff.; u. a.).

Diese seit langem bekannte Erscheinung der symbiontischen Stickstoffassimilation hat bei der taxonomischen Eingliederung der Knöllchenbakterien, die früher die Bezeichnung *Bacterium radicola* trugen, den Ausschlag gegeben (s. BERGEY, 1957). Die herkömmliche systematische Einordnung in die Gattung *Rhizobium* basiert auf der Virulenz der Knöllchenbakterien als charakteristisches Gattungsmerkmal und deren Wirtsspezifität als Artkriterium. Die durch zahlreiche Untersuchungen an Wurzelknöllchen gewonnenen Kenntnisse über den Verlauf der Bakterieninfektion, die Entstehung der Knöllchen wie über die Physiologie und Biochemie der biologischen Stickstoffbindung zeigen, daß die gegenseitigen Beziehungen zwischen Pflanze und Bakterium sehr komplexer Art sind und weiterer Klärung bedürfen (s. z.B. NUTMAN 1954 a und b). Darüber hinaus dürfte von allgemeinem Interesse die Frage sein, warum sich diese Symbiose nur bei den Leguminosen und hier wiederum vorwiegend bei den Papilionaceae und Mimosaceae ausgebildet hat. Die hohe Wirtsspezifität der Rhizobien dürfte vom physiologisch-chemischen Standpunkt, wie auch von der Evolution her gesehen, gleichermaßen interessant sein (MANIL 1958).

Agrobacterium tumefaciens ist der wohl bekannteste und meist untersuchte Vertreter der Gattung *Agrobacterium*. Dieses Bakterium ist der Erreger der sog. Wurzelhalsgallen oder auch "crown-galls". Diese "Gallen" sind Gewebewucherungen, die in der Natur besonders am Wurzelhals oder an der Stengelbasis vieler Pflanzen auftreten. Sie sind aber keineswegs auf diese Stellen beschränkt, sondern lassen sich auch an den anderen Organen der Pflanze durch Infektion künstlich gesetzter Wundstellen induzieren. Diese Wucherungen sind echte Tumoren und erfüllen die an neoplastische Gewebe zu stellenden Bedingungen: sie haben ein unbegrenztes Wachstum und behalten ihre Wachstumsautonomie sowohl in Gewebekultur, als auch nach Transplantation bei. Das Wachstum selbst erfolgt durch apolare Zellteilungen.

Neben diesen bakteriell bedingten Tumoren gehören zu den echten Pflanzenkrebsen noch die Wundtumoren, die durch ein Virus hervorgerufen werden, das durch Insekten aber auch mechanisch oder durch Pfropfung übertragen wird (BRAUN und STONIER 1958). Ferner sind die sog. genetischen Tumoren ebenfalls echte Neoplasmen. Es handelt sich hierbei um spontan auftretende Wucherungen, die regelmäßig an bestimmten Pflanzen auftreten. Als Ursache hierfür betrachtet man die genetische Konstitution der Pflanze. Das bekannteste und am gründlichsten untersuchte Beispiel hierfür sind Artbastarde der Gattung *Nicotiana* mit der Art *Nicotiana langsdorfii* (KOSTOFF 1930 siehe BRAUN und STONIER 1958). Wichtig ist die Feststellung, daß bei allen eben erwähnten Fällen pflanzlicher Tumoren bei gleichem Erscheinungsbild doch die Ursachen sehr verschieden sind.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich besonders mit dem "crown-gall"-Problem und haben weitreichende Aufschlüsse über die Tumorgenese geben können (zusammenfassende Darstellungen bei BRAUN und STONIER 1958; STAPP 1953; 1963; BOPP 1963; BERGMANN 1964; KLEIN 1965). Für das Studium des allgemein-biologisch interessanten Krebsproblems erweist sich die "Wurzelhalsgalle" als ein sehr geeignetes Objekt. Im Gegensatz zu tierischen und menschlichen Geweben werden pflanzliche Zellen, bedingt durch die starren

Zellulosezellwände, im Gewebeverband fixiert. Es besteht somit die Möglichkeit, die Herkunft der im Verlauf der Tumorentstehung neu gebildeten Zellen nach ihrer Lage im histologischen Schnitt abzuleiten. Eine weitere Folge des Aufbaues der pflanzlichen Zellen ist, daß die Abwanderung ganzer Gewebeteile im Pflanzenkörper nicht möglich ist, demnach auch keine Metastasen nachweisbar sind. Die Entstehung pflanzlicher Sekundärtumoren hat andere Ursachen (s. STAPP 1963).

Aus der Fülle der über dieses Thema erschienenen Arbeiten hat sich zwar noch kein vollständiges, aber doch im Prinzip ein allgemein zutreffendes Bild der Tumorgenese ergeben. Die Vorstellungen über die einzelnen Phasen der Krebsentstehung bei Pflanzen werden z.B. in dem von KLEIN und LINK (1955) dargestellten Schema veranschaulicht (Abb. 1).

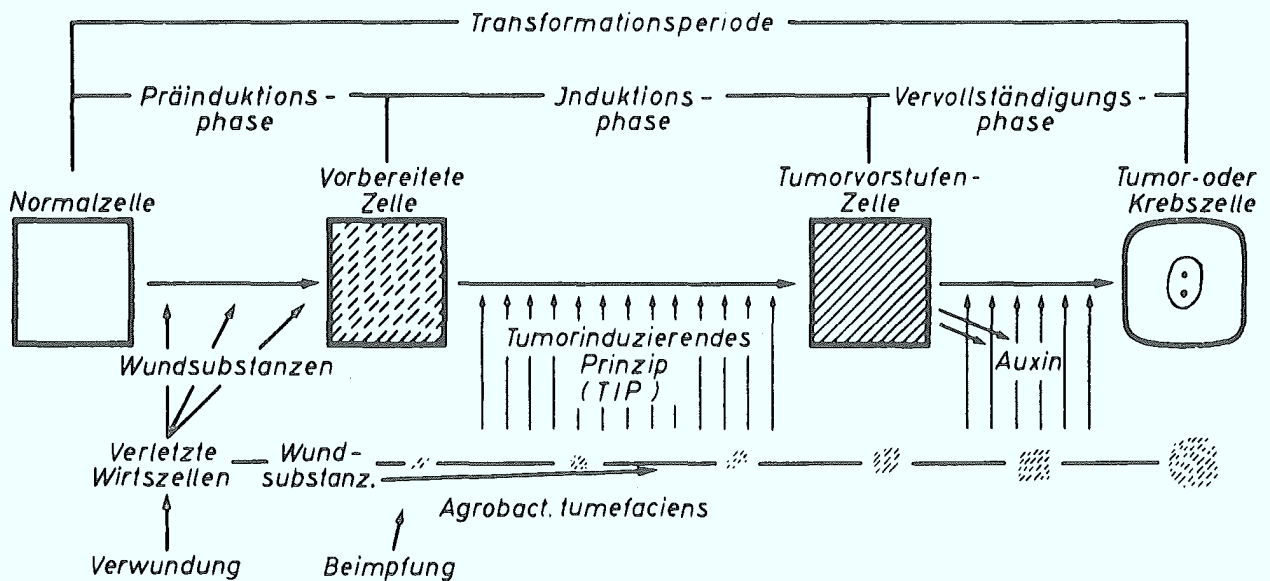


Abb. 1: Schema des Umwandlungsprozesses einer Normalzelle in eine primäre Tumorzelle. Nach KLEIN und LINK (1955); s. STAPP (1963, S. 119).

Voraussetzung für die Bildung eines Tumors ist eine Wunde, die innerhalb einer bestimmten Zeit mit virulenten Bakterien infiziert sein muß. Die ersten sichtbaren Folgeerscheinungen hiervon sind rege Zellteilungen, die zunächst wie bei einer normalen Wundheilung orientiert - die Teilungsspindeln stehen senkrecht zur Wundfläche - ablaufen. Im weiteren Verlauf aber erfolgen diese Zellteilungen nicht mehr zum Wundrand hin orientiert, sondern werden apolar. Es setzt ein anarchisches Wachstum ein, dessen Folge ein unorganisiertes Gewebe, der Tumor, ist. Diese Umwandlung normaler Zellen in Krebszellen erfolgt in der Induktionsphase (s. Abb. 1), in der die durch den Wundreiz konditionierten Zellen unter dem mittel- oder unmittelbaren Einfluß der virulenten Bakterien zu Tumorzellen transformiert werden. Diese Umwandlung erfolgt unter dem Einfluß des sog. "tumorinduzierenden Prinzips" (TIP), eines immer noch hypothetischen Faktors, dessen stoffliche Natur umstritten ist (BRAUN, 1947).

Auf die zahlreichen Versuche zur Klärung dieser Frage kann hier nicht näher eingegangen werden (s. STAPP 1963). Nur sei erwähnt, daß es bislang nicht eindeutig gelungen ist, eine Tumorinduktion auf zellfreiem Wege, d.h. mit Extrakten aus virulenten Bakterien, herbeizuführen (KLEIN und BRAUN 1960). BOPP (1960; 1961; 1963; 1964) kommt in seinen Untersuchungen über die Tumorinduktion, bei denen er spezifische Antimetaboliten der Desoxyribonucleinsäure (internationale Abkürzung: DNA s. RAUEN 1964) wie Bromuracil oder Fluordesoxyuridin verwendet, zu dem Schluß, daß das "tumorinduzierende Prinzip" (TIP) nach der Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* in der Wirtszelle die Synthese einer spezifischen DNA veranlaßt. Ob aber für den Prozeß der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ein Vorgang angenommen werden muß, der der bei Bakterien anzutreffenden genetischen Transformation vergleichbar wäre, dafür liegen bislang keine zwingenden Gründe vor (RATHSACK und BRUCKER 1961). Aussichtsreicher dürfte es sein, die Ursachen für die Entstehung der Tumorzelle in einem System zu suchen, das die Informationsabgabe des Zellkerns an das Cytoplasma steuert. Mit anderen Worten ist es naheliegend

anzunehmen, daß das TIP als Repressor bzw. Derepressor wirkt und dadurch eine Aktivierung bzw. Inaktivierung entsprechender Genorte bewirkt (vergl. BOPP 1963; BERGMANN 1964).

Neben Versuchen, die Vorgänge der Tumorinduktion zwischen Pflanzenzelle und virulentem Bakterium zu erfassen, fehlt es nicht an Untersuchungen, die sich dem Bakterium selbst widmen. Bis jetzt konnten jedoch in den Bakterien keine Stoffe oder spezifische Reaktionsabläufe nachgewiesen werden, die kausal mit der Tumorinduktion zusammenhängen. Zweifellos ist die Ätiologie des pflanzlichen Krebses komplexer Natur und sicher nicht durch einseitige Untersuchungen zu lösen. Da das "tumorinduzierende Prinzip" jedoch direkt oder indirekt vom virulenten Bakterium produziert wird, könnten genetische Untersuchungen an *Agrobacterium tumefaciens* darüber wichtige Informationen vermitteln. Es ist bekannt, daß sich diese Bakterienart aus heterogenen Stämmen zusammensetzt, die sich biochemisch, physiologisch, serologisch und auch morphologisch voneinander unterscheiden (s. STAPP 1963). Bezüglich der Pathogenität sind sowohl Stämme mit einem breiten Wirtsspektrum als auch solche mit einer manchmal nur auf eine Pflanzenart beschränkten Virulenz bekannt. Hinzu kommt eine Abstufung der Virulenz, die von hoch pathogenen über abgeschwächte ("attenuated") bis zu avirulenten Stämmen reicht. KLEIN und Mitarbeiter (KLEIN und KLEIN 1953; 1956; KLEIN und LINK 1955) wiesen nach, daß die Virulenz übertragbar ist. Durch Kultur avirulenter Bakterien in Gegenwart abgetöteter virulenter Bakterien (sog. Bactrine, siehe KLEIN und KLEIN 1953), von entsprechenden DNA-Präparaten oder in Kulturfiltraten pathogener Stämme ließ sich die Virulenz auf diese avirulenten Formen übertragen. Ebenso konnten in entsprechender Weise Änderungen bezüglich der Wirtsspezifität innerhalb virulenter Stämme induziert werden. Die so übertragenen Eigenschaften erwiesen sich als genetisch fixiert. Die Autoren folgerten, daß diese Übertragung auf dem Wege einer genetischen Transformation erfolgt sein müsse. Sie nahmen an, daß viele Genorte die Synthese eines spezifischen TIP steuern. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Übertragung der Virulenz

von *Agrobacterium tumefaciens* auch auf andere Arten wie *A. radiobacter* und *A. rubi* und in einem Fall sogar auf einen Stamm von *Rhizobium leguminosarum* gelang (KLEIN und KLEIN 1953).

Das TIP ist ein sehr empfindliches und instabiles System. Bereits Temperaturen um 35°C können es inaktivieren, ohne dabei die virulenten Bakterien in ihrer Lebensfähigkeit merklich zu beeinträchtigen. Auch ist bekannt, daß durch Kultivierung der Bakterien in Gegenwart verschiedener Aminosäuren, wie Glycin, Phenylalanin u.a., die Virulenz bis zur Avirulenz abgeschwächt werden kann. Diese Virulenzschwächung ist jedoch reversibel, denn durch Rekultivierung in Abwesenheit der betreffenden Aminosäuren werden die Bakterien allmählich wieder virulent (LANEN, BALDWIN und RIKER 1952; STAPP 1958). Da der Mechanismus dieser Inaktivierung ungeklärt ist und durchaus noch andere unbekannte Faktoren mit ähnlichen Eigenschaften existieren können, ist es denkbar, daß eine latente Virulenz Avirulenz vor-täuschen und somit genetische Untersuchungen über die Virulenz sehr erschweren könnte. Solche Untersuchungen würden aber wesentlich erleichtert, wenn die Übertragung der Virulenz auf nachweislich apathogene, taxonomisch *Agrobacterium tumefaciens* nahestehende Organismen gelänge.

In vorliegender Arbeit wird daher die Frage geprüft, ob eine Übertragung der Virulenz durch genetische Transformation möglich ist, wie das von KLEIN und KLEIN (1953, 1956) angenommen wurde. Es lag nahe, *Rhizobium*-Stämme als genetische Acceptoren für das "transformierende Prinzip" aus virulenten Stämmen von *Agrobacterium tumefaciens* zu verwenden. Es bestand bei diesen Untersuchungen die Hoffnung, durch den wechselseitigen Austausch bzw. Einbau genetischen Materials zwischen *A. tumefaciens* und Stämmen von *Rhizobium* möglicherweise Aufschlüsse über die genetische Grundlage der bakteriellen Virulenz in bezug auf die Fähigkeit zur Tumorinduktion zu gewinnen. Andererseits sollte unser Augenmerk auch auf Probleme gerichtet werden, die mit den Besonderheiten der pflanzlichen Symbiose der Knöllchenbakterien zusammenhängen.

II. Das Wesen der genetischen Transformation

Unter einer genetischen Transformation versteht man die Integration exogenen genetischen Materials in das Genom einer Acceptorzelle. Diese Definition setzt voraus, daß das genetische Material identisch mit einer Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist und diese in freier Form vorliegt. Unter der Bezeichnung Integration wird die ständige Bindung zwischen den miteinander reagierenden genetischen Materialien verstanden, die zur Folge hat, daß die aufgenommene DNA in das Genom der Acceptorzelle eingebaut und gemeinsam mit diesem redupliziert wird (SCHAEFFER 1964). An der Transformation sind zwei Partner beteiligt, deren Rolle als DNA-Donator bzw. als DNA-Acceptor notwendigerweise verschieden ist. Im Prinzip ist die Übertragung bzw. der Austausch von DNA wechselseitig möglich, ohne daß hierfür eine sexuelle Differenzierung erforderlich ist. Es ist wichtig festzustellen, daß die durch die Transformation neu auftretenden, genetisch fixierten Eigenschaften der transformierten Zelle ihre Ursache in der Rekombination zwischen bereits bestehenden genetischen Strukturen haben. In dieser Beziehung unterscheidet sich die Transformation wesentlich von einer Mutation (SCHAEFFER 1964).

Das Phänomen der Transformation wurde von GRIFFITH (1928) entdeckt. Er konnte beweisen, daß lebende avirulente (ungekapselte) Pneumococcen gleichzeitig mit hitzegetöteten, virulenten (gekapselten) Bakterien (Vaccine) in Mäuse geimpft, zur Entstehung virulenter Pneumococcen führte, die den Tod der Versuchstiere verursachten. Es war bekannt, daß durch Mutation aus gekapselten virulenten Formen avirulente, ungekapselte Organismen entstehen können. GRIFFITH fand in den an Pneumonie gestorbenen Mäusen gekapselte Bakterien. Von großer Bedeutung war aber die Feststellung, daß diese virulenten Formen nicht dem virulenten Wildtyp entsprachen, aus denen die avirulenten mutativ entstanden waren. Vielmehr konnte nachgewiesen werden, daß der auftretende virulente Typ dem des eingeimpften hitzegetöteten Stammes entsprach. In den nachfolgenden Arbeiten

gelangen DAWSON und SIA (1931) solche Transformationen auch in vitro. ALLOWAY (1933) konnte nachweisen, daß zellfreie Extrakte aus virulenten Stämmen ebenfalls die Umwandlung avirulenter Formen in virulente verursachen können. In den bahnbrechenden Untersuchungen von AVERY, MacLEOD und McCARTY (1944) konnte schließlich das "transformierende Prinzip" als Desoxyribonucleinsäure identifiziert werden. Damit war erstmalig der Beweis geführt, daß DNA Träger der genetischen Information ist. Die dynamische Entwicklung der Molekularbiologie nahm letztlich durch diese Entdeckung ihren Anfang. Die zwangsläufige Folge waren physikalisch-chemische Analysen der Struktur und Zusammensetzung der DNA, die im Watson-Crick-Modell ihren Ausdruck finden, und genetische Untersuchungen, die zur Klärung des Transformationsprozesses beitrugen und darüber hinaus für die heutigen Vorstellungen der zellulären Lebensabläufe mitbestimmend waren.

Die vorangestellte Definition der Transformation ist das Ergebnis zahlreicher Untersuchungen, die in einer sehr umfangreichen Literatur ihren Niederschlag gefunden haben. Es sei daher hier auf zusammenfassende Darstellungen von RAVIN (1961) und SCHAEFFER (1964) hingewiesen. Nach den im wesentlichen an *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* und in der Gattung *Neisseria* gewonnenen Erkenntnissen kann der Transformationsvorgang in mehrere Einzelschritte zerlegt werden. Die Anwesenheit biologisch aktiver DNA und aufnahmebereiter, kompetenter Zellen sind Voraussetzung für die nacheinander erfolgenden Prozesse: 1. Adsorption und Eindringen der DNA in die Acceptorzelle; 2. Synapsis der DNA-Moleküle; 3. Integration und genetische Rekombination und 4. die Expressivität neuer Eigenschaften. Diese Schritte sollen hier nur soweit besprochen werden, als sie zum Verständnis des folgenden erforderlich sind.

Die biologisch aktive DNA läßt sich nur durch das Transformationsexperiment selbst nachweisen. Jedoch haben sich einige physikalisch-chemische Eigenschaften der DNA als brauchbare Kriterien erwiesen, die zur Beurteilung der Donator-DNA herangezogen werden können und hier besprochen werden.

AVERY und Mitarbeiter (AVERY et al. 1944; McCARTY und AVERY 1946 u. a.) stellten bereits fest, daß das "transformierende Prinzip" gegenüber proteolytischen Enzymen sowie Ribonucleasen beständig ist, dagegen durch Einwirkung von Desoxyribonucleasen (DNasen) vollkommen zerstört wird. Die depolymerisierende Eigenschaft dieser Enzyme wird daher bei der praktischen Durchführung einer Transformation als Kontrolle benutzt. Wird nämlich die Donator-DNA vor Zugabe zu den Acceptorzellen mit DNase behandelt, darf keine Transformation erfolgen. Treten trotzdem Bakterien mit neuen Eigenschaften auf, so sind sie entweder durch spontane Mutation entstanden oder aber die Sterilität der Donator-DNA ist nicht gewährleistet.

Es ist bekannt, daß bei einer Transformation zwar nur Teile des DNA-Moleküls (> 2000 Nucleotide, FOX 1964) in das Acceptor-genom integriert werden, jedoch für den Kontakt mit der aufnehmenden Zelle makromolekulare DNA notwendig ist. So stellten LITT et al. (1958) fest, daß die transformierende Aktivität des DNA-Moleküls von seinem Molekulargewicht abhängt. Nach ihren Angaben darf transformierende DNA ein Molekulargewicht von 1×10^6 nicht unterschreiten. Es ergibt sich somit die Forderung nach einer größenordnungsmäßigen Bestimmung des Molekulargewichtes der Donator-DNA.

Eine weitere Anforderung an die transformierende DNA ist deren Doppelstrangkongfiguration. Diese läßt sich nachweisen durch die beim Erhitzen von DNA-Lösungen auftretende Erscheinung der Hyperchromizität, d. h. einem Anstieg der UV-Absorption, der im wesentlichen durch Sprengung der Wasserstoffbindungen zwischen den komplementären Polynucleotidketten bedingt ist. Die Höhe dieser Hyperchromizität, wie der Verlauf der thermischen Denaturierungskurve (MARMUR und DOTY 1959) sind Ausdruck und Maß für den Ordnungsgrad der DNA (s. Abb. 8). Erwähnt sei auch die Reaktion der DNA mit Formaldehyd, die zu Verschiebungen im UV-Absorptionsspektrum und gleichzeitig zu einer erhöhten UV-Absorption führt. Formaldehyd reagiert speziell mit denaturierter DNA und ist wirkungslos gegenüber transformierender, doppelsträngiger DNA (ZAMENHOF et al. 1953; FRAENKEL-CONRAT

1954). Es lassen sich auch auf diese Weise Aussagen über den molekularen Zustand der Nucleinsäure machen.

Zuweilen wird die Hitzeinaktivierung der DNA in ähnlicher Weise wie die eben erwähnte Behandlung mit DNase als Kontrolle bei Transformationsversuchen benutzt (z. B. YAMANE und HIGASHI 1963). Diese beruht auf der relativen Hitzebeständigkeit des "transformierenden Prinzips", wie bereits ALLOWAY (1933) feststellte. Extrakte aus *Pneumococcus* behalten ihre biologische Aktivität auch nach einer Erhitzung auf 60°C unverändert bei. Dagegen wird die Transformationsaktivität durch höhere Temperaturen stark reduziert. Man weiß heute, daß durch kurzzeitiges Erhitzen einer DNA-Lösung bis nahe an den Siedepunkt eine thermische Denaturierung stattfindet, bei der die Wasserstoffbindungen gesprengt werden (s. oben) und die DNA vom geordneten Doppelstrangstadium in die einsträngige Knäuelform übergeht (DOTY et al. 1960; MARMUR und LANE 1960). Die Folge davon ist eine abrupte Inaktivierung der Transformationseigenschaften der betreffenden DNA. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß zwar die biologische Aktivität reduziert wird, jedoch meist eine sehr geringe Restaktivität zurückbleibt. Auf das diesbezügliche Schrifttum kann hier nur verwiesen werden (SCHAEFFER 1964). Nach Ansicht vieler Autoren ist dabei die Strangtrennung der DNA vollständig, jedoch ist eine Renaturierung, d. h. eine teilweise Zusammenlagerung komplementärer, einsträngiger Molekülabschnitte (s. Abb. 52) zu doppelsträngigen Strukturen nicht immer auszuschließen. Es ist aber auch - wie in Abb. 2 schematisch wiedergegeben wird - möglich, daß intramolekulare doppelsträngige Strukturen mit biologischer Aktivität entstehen können.

Diese Vorstellung wird durch neuere Untersuchungen von BARNHART (1965) erhärtet. Aus diesem Grunde dürfte die Hitzeinaktivierung der DNA als Kontrolle bei Transformationsansätzen nicht eindeutig genug sein. Andererseits muß die Doppelstrangkonfiguration der DNA als Voraussetzung für eine Transformation dahingehend verstanden werden, daß auch intramolekulare doppelsträngige Molekülstrukturen

biologische Aktivität besitzen können.

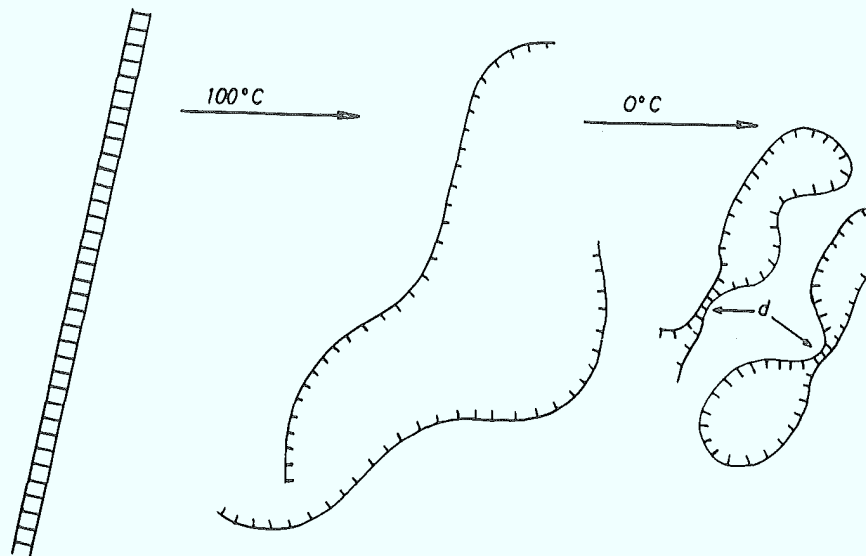


Abb. 2. Thermische Denaturierung von DNA und Bildung intramolekularer, doppelsträngiger Strukturen (d) mit biologischer Restaktivität.

Die genetische Transformation wird dadurch eingeleitet, daß DNA sich an die aufnehmende Zelle anlagert (Adsorption) und in das Innere eindringt (Penetration; vergl. S. 8). Dieser Vorgang setzt die Aufnahmebereitschaft der Zelle, die sog. Kompetenz, voraus. Hierunter versteht man "den vorübergehenden physiologischen Zustand, in dem sich das Bakterium im Augenblick der Einwirkung von DNA befinden muß, wenn eine Transformation erfolgen soll" (SCHAEFFER 1964). Die Kompetenz tritt nur unter bestimmten Kulturbedingungen auf. Da es kein universell anwendbares Transformationsmedium gibt und die Bedingungen für die Kompetenz von Bakterienstamm zu Bakterienstamm verschieden sind, müssen die optimalen physiologischen Bedingungen für die Transformation in jedem Falle empirisch ermittelt werden. Die Kompetenz entwickelt sich in Abwesenheit der transformierenden

DNA und ist eine Eigenschaft der Bakterienzelle. Einmal ausgebildet, führt sie meistens zum irreversiblen Beginn der Transformation.

Es werden viele Faktoren diskutiert, die die Entstehung der Kompetenz beeinflussen. So nehmen z.B. BARNHART und HERRIOTT (1963) an, daß die Ionenabhängigkeit der optimalen Bindung von DNA an Zellen von *Haemophilus influenzae* für die Beteiligung spezifischer Ladungsmuster auf der Oberfläche der rezipierenden Zelle spricht. Die Ursachen für die selektive Aufnahme und Permeation der exogenen DNA sind noch weitgehend ungeklärt. Neuere Untersuchungen von TOMASZ und HOTCHKISS (1964) an *Pneumococcus* haben ergeben, daß die Kompetenz der Zellen durch ein makromolekulares Zellprodukt, vermutlich ein Protein, induziert ("Aktivator") wird. Ein zweiter Faktor ("Inhibitor") hemmt diesen Vorgang. Eine Transformation kann aber auch in Frage gestellt werden, wenn der potentielle Acceptor DNase ins Kulturmedium abgibt. Ferner wird die Transformation kompetitiv durch nichtspezifische DNA gehemmt. Selbst heterologe DNA, z.B. aus Kalbsthymus, im Transformationsansatz wirkt sich hemmend aus (HOTCHKISS 1954; ALEXANDER et al. 1954).

Das Eindringen der DNA in die kompetente Acceptorzelle erfolgt unmittelbar nach der Adsorption an die Zelle. Dieser Vorgang ist insofern experimentell wichtig, da zu diesem Zeitpunkt die DNA nicht mehr durch Zugabe von DNasen inaktiviert werden kann. Es besteht so die Möglichkeit, den Transformationsprozeß zu beliebigen Zeiten zu unterbrechen und Einzelvorgänge zu untersuchen. Experimente mit radioaktiv markierter (^{32}P), transformierender DNA haben gezeigt, daß das Eindringen der DNA in zwei Schritten erfolgt, einem reversiblen, DNase-empfindlichen und einem irreversiblen, der resistent gegenüber DNasen ist. Es wird mehr DNA an die Zelle gebunden als tatsächlich eindringt. Die reversible Bindung ist eine intermediäre Stufe, die der irreversiblen Fixierung der DNA vorausgeht. Der Vorgang der Transformation läßt sich wie eine Enzym-Substrat-Reaktion formulieren:



Hierbei bedeuten: B(s) die Anzahl der Adsorptionsstellen auf den Bakterien, von der man annimmt, daß sie proportional zur Anzahl der Bakterien ist; DNA die Konzentration von DNA-Molekülen und B(tr) die Zahl der Bakterien mit irreversibel eingeleiteter Transformation (FOX und HOTCHKISS 1957). Wie man sieht, besteht eine Beziehung zwischen der Anzahl der Bakterien und der Konzentration an DNA.

Wenngleich sich die selektive Permeation exogener DNA mit anschließender Transformation vornehmlich auf entsprechende DNA aus nahe verwandten Bakterienstämmen erstreckt, so scheint doch das Eindringen der DNA selbst, die sog. Penetration, nicht spezifisch zu sein. Es sind Fälle bekannt, bei denen z.B. DNA aus *Escherichia coli* in Zellen von *Pneumococcus* nachweislich eindrang, ohne jedoch zur Transformation zu führen (LERMAN und TOLMACH 1957).

Die Prozesse, die nach der irreversiblen Bindung der eingedrungenen DNA in der Acceptorzelle erfolgen und schließlich zum genetisch veränderten Bakterium, dem Transformanten, führen, sollen hier nicht besprochen werden. Nach heutiger Kenntnis beschränkt sich der Vorgang der Transformation nur auf Bakterien. Angaben über geglückte Transformationen bei anderen Organismen finden sich zuweilen. So berichtet OPPENOORTH (1962) über Transformationsversuche an Hefen, bei denen die Fähigkeit zur Vergärung von Disacchariden durch DNA übertragen werden konnte. Die Deutung dieser Versuchsergebnisse als genetische Transformation wird jedoch nicht allgemein als berechtigt angesehen (ESSER und KUENEN 1965, S. 300). In der neueren Literatur werden Angaben darüber gemacht, daß in Gewebekulturen tierischer und menschlicher Zellen die Aufnahme exogener DNA nachgewiesen und Transformationsphänomene festgestellt werden konnten (u.a. GARTLER 1959; SZYBALSKA et al. 1962; PODGAJETSKAJA et al. 1964). Die Frage, wieweit diese Erscheinungen mit der bakteriellen Transformation vergleichbar sind, soll hier offenbleiben.

Die genetische Transformation, als Möglichkeit Bakteriengenetik auf molekularer Basis zu betreiben, hat zwangsläufig zur Folge, daß

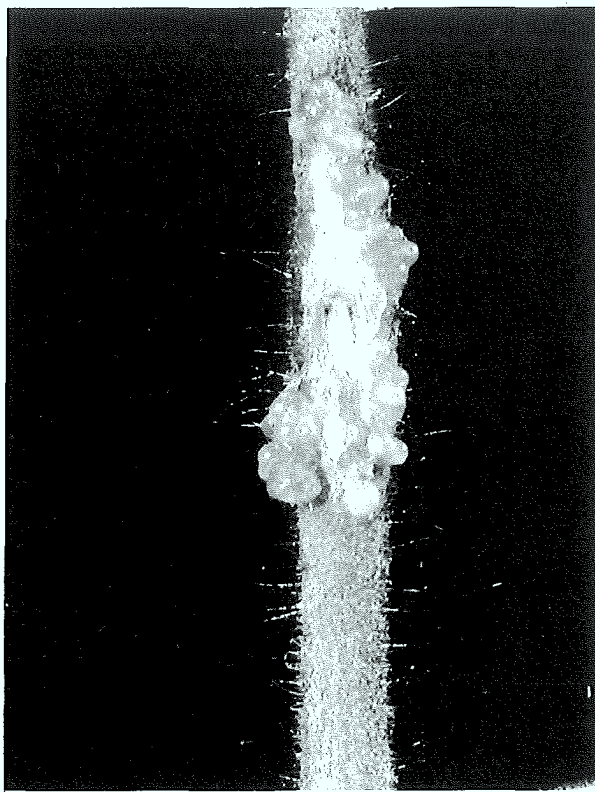


Abb. 3: Wucherungen an Tomatenstengel nach Beimpfung mit dem Ansatz: Rh. trifolii 582 + Bactrin aus Agrobacterium tumefaciens-Stamm Dahlia-Ra.

Diese Befunde lassen zwar den Schluß zu, daß es sich in diesen Fällen um eine Übertragung der Virulenz im Sinne von KLEIN und KLEIN handeln kann. Jedoch erfordert der eindeutige Beweis für das Vorliegen einer echten genetischen Transformation umfassendere Untersuchungen. Wie im Kapitel II ausgeführt, besteht heute kein Zweifel mehr daran, daß das "transformierende Prinzip" identisch mit freier DNA ist. Diese Tatsache wird bekanntlich (s. S. 7) der Definition der Transformation zugrundegelegt. Es erschien daher angebracht, von weiteren Experimenten mit komplexen, DNA-haltigen Systemen, wie den Bactrinen, abzusehen und mit gereinigten und möglichst nativen DNA-Präparaten zu arbeiten.

A. Durchführung einer Transformation

In den folgenden Untersuchungen wurden DNA-Präparate in noch zu beschreibender Weise aus *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm Dahlia-Ra hergestellt und Kulturen der gleichen *Rhizobium*-Stämme zugesetzt, wie sie bei den Bactrin-Versuchen (s. oben) verwendet wurden. Auch hierbei konnten wir virulente Formen nachweisen. Die durch sie induzierten tumorartigen Gebilde entwickelten sich langsamer als bei Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*. In die Untersuchungen bezogen wir weitere Stämme von *A. tumefaciens* und *Rhizobium* ein und verwendeten sie als DNA Donatoren bzw. als Acceptoren.

Bei diesen Versuchen wurde nur auf die Fähigkeit der entsprechenden Transformationsansätze zur Induktion tumorartiger Wucherungen an den Versuchspflanzen selektioniert. In diesen Testen erwies sich besonders *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C als guter Acceptor für die DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 (Abb. 11). Dieser aus Wurzelknöllchen von Erbsenpflanzen der Sorte "Kleine Rheinländerin" isolierte *Rhizobium*-Stamm trägt die Laborbezeichnung "Stamm C" und wurde entsprechend seiner Herkunft als *Rh. leguminosarum* (s. S. 1) klassifiziert. *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147 wird unter dieser Bezeichnung in der Sammlung des Biologischen Institutes der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften in Prag geführt und soll auf den von SMITH et al. (1911) isolierten Originalstamm zurückgehen. Diese beiden Bakterienstämme wurden für die nun zu beschreibenden Untersuchungen ausgewählt. Mit ihnen wurde nachgewiesen, daß tatsächlich eine Übertragung der Virulenz zwischen diesen beiden Partnern stattfindet und wir als Mechanismus hierfür eine genetische Transformation annehmen dürfen.

1. Isolierung der Donator-DNA

Die an eine biologisch aktive DNA zu stellenden Anforderungen wurden bereits besprochen (s. S. 8 ff.). Es stellt sich die Aufgabe,

möglichst reine, hochmolekulare DNA zu gewinnen, deren molekulare Konfiguration dem nativen Zustand in der Zelle nahekommen soll. Um eine Verschleppung lebender Donator-Zellen in den Transformationsansatz zu vermeiden, ergibt sich als weitere sehr wichtige Bedingung die Sterilität der DNA. In dem hier gesteckten Rahmen dürfte die Gewähr für eine transformierende Nucleinsäure dann gegeben sein, wenn die aus *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147 isolierte DNA steril ist, Doppelstrangkonfiguration besitzt und ein Molekulargewicht nicht unter 1×10^6 (LITT et al. 1958) hat.

Der für die präparative Gewinnung von DNA erarbeitete Arbeitsgang basiert auf den Methoden von MARMUR (1961), KIRBY (1957, 1958) und KIT (1960), die in entsprechender Weise kombiniert, den experimentellen Erfordernissen angepaßt wurden:

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in Mannit-Nährlösung 60 h bei 28°C in 1-Literkolben mit je 250 ml Nährmedium (je nach Bedarf bis zu 10 l Nährlösung insgesamt). Die Bakterien werden bei $15\,000 \times g$ abzentrifugiert, das Sediment mit dest. Wasser aufgenommen, wieder abzentrifugiert und in 0,15 M NaCl + 0,1 M Titriplex III (Merck), pH 8, suspendiert (je 2 g feuchte Bakterienmasse ca. 25 ml Lösung).

Lysis. Nach Zusatz von 5 mg Lysozym zu je 100 ml dieser Suspension wird sie 1 h bei 37°C im Thermostaten inkubiert, anschließend Natriumlaurylsulfat zugegeben (zu 100 ml des viskosen Lysozymaufschlusses je 15 ml einer 25%igen Lösung von Natriumlaurylsulfat) und 10 min im Wasserbad bei 60°C gehalten, danach für ca. 1 h im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und dann mit zwei Volumina 96%igem Äthanol versetzt. Dieses Gemisch wird mit einem Glasstab gerührt, der dabei entstehende fädige Niederschlag auf den Stab gewickelt und der übrige Niederschlag durch Filtration gewonnen. Das gesamte Äthanolpräzipitat wird in einer 6%igen Lösung von Natrium-p-aminosalicylat suspendiert (je 1 g Bakterienausgangsmasse 15 ml Lösung) und dabei zum größten Teil gelöst.

Phenolbehandlung. Zur Entfernung von Protein wird ein Volumen dieser Lösung (notfalls klarzentrifugiert) mit einem Volumen 80%igem Phenol 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt, nach Zentrifugation die obere Phase abgenommen und zur Beseitigung von Phenol vier- bis fünfmal ausgeäthert. Durch Einleiten von Stickstoff verdrängt man den Äther aus der wäßrigen Phase. Nach Äthanol-fällung (s. oben) und Lösen in 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat (pH 7) erfolgt Zusatz von RNase ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$), 30 min Inkubation bei 37°C und dann 1 h Aufbewahrung im Kühlraum. Anschließend wird der Ansatz mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v) geschüttelt und nach Zentrifugation die obere Phase abgenommen. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis an der

Phasengrenze der beiden Lösungsmittel kein denaturiertes Protein mehr sichtbar ist. Dann fällt man die DNA erneut mit Äthanol, löst sie in 0,015 M NaCl + 0,0015 M Natriumcitrat (pH 7) und fällt sie zur Entfernung noch vorhandener Beimengungen an Polysacchariden ein- bis zweimal in folgender Weise um: 9 ml der DNA-Lösung versetzt man mit 1 ml 3 M Natriumacetat + 0,001 M Titriplex III (Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure, Merck) und fällt durch langsames Eintropfen von insgesamt 5,4 ml Isopropanol unter kräftigem Rühren die DNA aus. Sie wird in gefällter Form nacheinander mit 75%-, 80%-, 90%- und 95%igem Äthanol ausgewaschen und nach Trocknung im Exsiccator bei -20°C aufbewahrt.

Zur Sterilisation der DNA für den Transformationsansatz wird sie in sterilem NaCl-Na-citrat-Puffer (0,15 M NaCl + 0,015 M Na-citrat) gelöst, mit Chloroform versetzt, 24 h bei Zimmertemperatur gerührt (Magnetrührer), die wässrige Lösung dann von der Chloroformphase abgegossen, die DNA unter sterilen Bedingungen mit Äthanol ausgefällt und erneut in sterilem Puffer gelöst. Solche DNA-Präparate fanden bei den Transformationsversuchen Anwendung. In einigen Fällen erfolgte die Aufbewahrung der DNA in sterilen, unter Vakuum nach vorangegangener zentrifugaler Gefriertrocknung abgeschmolzenen Ampullen. Meistens jedoch fand die Sterilisation der DNA unmittelbar vor Durchführung der Transformation statt. In jedem Falle wurde die Sterilität der DNA-Präparate durch Ausstriche auf Mannit-Agar, zuweilen auch auf Fleischextrakt-Agar sowie in den entsprechenden flüssigen Medien geprüft.

2. Charakterisierung der DNA

Aus naheliegenden Gründen legten wir bei allen Untersuchungen besonderen Wert auf die Sterilität der benutzten DNA-Präparate. Bietet allein schon die im eben beschriebenen Präparationsgang erfolgende Behandlung mit Phenol (Endkonzentration 40%) Gewähr für die totale Abtötung der Donatorzellen, so wurde noch zusätzlich die Sterilisierung mit Chloroform durchgeführt. Wie die entsprechenden Teste beweisen, bewirken diese Maßnahmen die Sterilität der DNA-Lösungen. Da ferner *A. tumefaciens* kein Sporenbildner ist, scheidet die Gefahr einer Kontamination durch nicht geschädigte Sporen aus. Allerdings können die genannten Verfahren noch zusätzlich zu den ohnehin beim Präparationsgang erfolgenden Veränderungen der nativen DNA - z.B. Reduzierung des Molekulargewichtes, chemische Reaktionen - zu Denaturierungen

und damit zur biologischen Inaktivierung führen. Aus diesem Grunde soll hier zunächst über weitere Untersuchungen berichtet werden, die zur Charakterisierung einer transformierenden DNA (s. S. 8 ff.) notwendig sind.

Für die Analyse der chemischen Zusammensetzung verschiedener, in gleicher Weise gewonnener DNA-Präparate aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 wurden der Gehalt an Phosphor nach Aufschluß mit siedender 70%iger Perchlorsäure kolorimetrisch nach der Methode von BERENBLUM und CHAIN (1938) an Protein nach der modifizierten Biuret-Methode von ZAMENHOF und CHARGAFF (s. ZAMENHOF 1957, S. 702) und die Beimengungen an Ribonucleinsäure (RNA) nach der Methode von CERIOTTI (1955) unter Verwendung einer Vergleichs-DNA (DNA aus Lachssperma, California Corp. Los Angeles) mit bekanntem RNA-Gehalt bestimmt. Die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte anhand einer Eichkurve kolorimetrisch nach der Methode von BURTON (1956) oder spektroskopisch, wobei wir den Umwandlungsfaktor von $0,02 \times E_{260}$ für 1μ native (doppelsträngige) DNA/ml benutzten (SUEOKA und CHENG 1962). Dieser gilt für die Schichtdicke der Küvetten von $d = 1$ cm.

Der Verlauf der UV-Absorptionskurve kann ebenfalls zur Beurteilung der Reinheit von Nucleinsäurelösungen herangezogen werden. Eimal interessiert dabei die qualitative Absorption (s. Abb. 48), d.h. die Lage von Absorptionsmaximum und -minimum und die Quotienten E_{260}/E_{232} und E_{260}/E_{280} . Diese errechnen sich aus den Extinktionen im Absorptionsminimum bei $232 \text{ m}\mu$ (E_{232}), im Absorptionsmaximum bei $260 \text{ m}\mu$ (E_{260}) und der Absorption bei $280 \text{ m}\mu$ (E_{280}), dem Absorptionsmaximum vieler Eiweißkörper, die als UV-absorbierende Störstoffe vor allem in Frage kommen. Ferner läßt die Ermittlung des atomaren Extinktionskoeffizienten auf der Phosphorbasis $\xi(P)$ Rückschlüsse auf die Reinheit aber auch auf den molekularen Zustand (z.B. Hyperchromizität s. S. 9) der DNA zu. Er errechnet sich wie folgt:

$$\xi(P) = \frac{30,98 \times E_{260}}{c \times d}$$

Dabei bedeuten E_{260} = Extinktion bei 260 m μ ; c = Phosphorgehalt in g/l; d = Schichtdicke der Meßküvette in cm; 30,98 ist das Atomgewicht von Phosphor (CHARGAFF und ZAMENHOF 1948).

In Tabelle 1 haben wir die mit den beschriebenen Methoden ermittelten Analysendaten zusammengestellt.

Tabelle 1. Charakterisierung von DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147

	% Phosphor	E_{260}/E_{232}	E_{260}/E_{280}	$\xi(P) 260 m\mu$	% RNA	% Protein
DNA-147	8,4	2,10	1,80	6447	0,52	< 1

Diese Daten (Tabelle 1) weisen die hier untersuchte DNA als eine in chemischer und spektroskopischer Hinsicht "saubere" Nucleinsäure aus, wobei besonders auf den niedrigen Gehalt an RNA und Protein hingewiesen wird.

Mit Hilfe der Anthron-Reaktion, ein Nachweis für Kohlenhydrate (s. HASSID und ABRAHAM 1957, S. 35 ff.), wiesen wir jedoch nach, daß die DNA nicht frei von Kohlenhydraten ist, die als Polysaccharide vorliegen dürften. Bei der präparativen Darstellung der DNA (s. S.18ff.) wird zwar der größte Teil der Polysaccharide entfernt. Da jedoch diese Prozedur in starkem Maße die Ausbeute an Nucleinsäure herabsetzt, kann sie nicht beliebig oft wiederholt werden. Wenngleich wir im vorliegenden Falle den Gehalt der DNA-Präparate an Polysacchariden vernachlässigten, ergab sich doch, wie später gezeigt wird, besonders bei der Darstellung von DNA aus einigen Rhizobium-Stämmen die Notwendigkeit einer weiteren Reinigung der Präparate. Polysaccharide, vermutlich Bestandteil des extrazellulären Bakterienschleimes, haben die unangenehme Eigenschaft, ebenso wie DNA bei der Äthanol-fällung fädig auszufallen. In der Literatur finden sich zwar Angaben darüber, daß Trans-

formationen mit Präparaten aus dem Bakterien Schleim verschiedener Rhizobium-Stämme gelungen sind (z.B. LJUNGGREN 1961), es ist aber anzunehmen, daß man das "transformierende Prinzip" hierbei weniger im Schleim, als vielmehr in extrazellulär vorliegender DNA zu suchen hat. Für diese Annahme sprechen die Untersuchungen z.B. von CATLIN und CUNNINGHAM (1958).

Es soll hier lediglich darauf verwiesen werden, daß unsere DNA-Präparate noch Stoffe enthalten, die bei der üblichen chemischen Charakterisierung (Tabelle 1) nicht berücksichtigt werden. Da sich die Gegenwart in später zu beschreibenden Fällen (s. Kapitel V) als sehr störend auswirkte, ergab sich die Notwendigkeit, nach Methoden zu suchen, die die Abtrennung von Polysacchariden aus DNA-Präparaten ermöglichen. Die hierfür entwickelte Methode soll im Prinzip an unserer Donator-DNA demonstriert werden.

Diese Trennung von DNA und Polysacchariden gelang durch Elektrophorese. Hierfür stand die "Elphor VaP-Apparatur" (Bender und Hobein, München) zur Verfügung, die nach GRASSMANN und HANNIG entwickelt wurde. Wie in Abb. 4 schematisch dargestellt wird, beruht das Prinzip dieser kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese darin, daß einem quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes strömenden dünnen Pufferfilm an einer Stelle (Auftragungspunkt) kontinuierlich das zu trennende Substanzgemisch als Lösung zugeführt wird. Ungeladene Teilchen wandern dann in der Richtung der gleichmäßig strömenden Pufferlösung, während geladene Stoffe entsprechend abgelenkt werden und je nach Strömungsgeschwindigkeit des Puffers und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in die verschiedenen Auffanggläser gelangen.

Da Polysaccharide nur eine geringe elektrophoretische Beweglichkeit gegenüber DNA haben, läßt sich eine Trennung beider nach diesem Prinzip ermöglichen. Für diesen Zweck erwies sich ein Puffer bestehend aus 9,7 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan pro l, durch Zugabe von 2 M Citronensäure auf pH 8,6 eingestellt, als geeignet. Bei einer Spannung von 1950 V, einer Stromstärke von 85 mA und einer beförderten Puffermenge von ca. 200 ml/h bei geringer Dosierung der

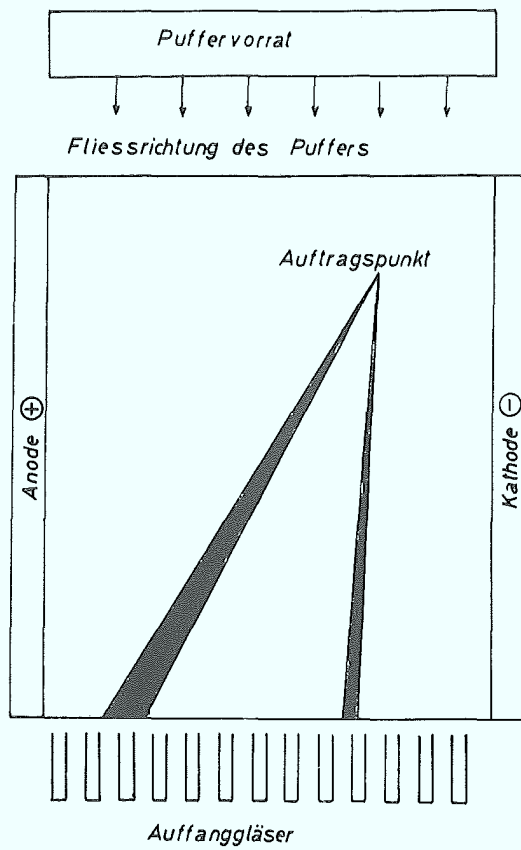


Abb. 4
Schema der
kontinuierlichen
Ablenkungs-
elektrophorese

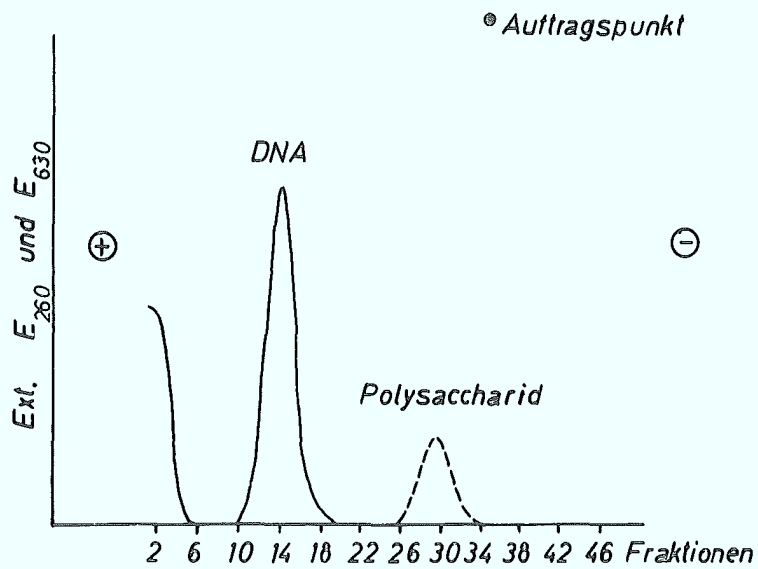


Abb. 5 Elektrophoretische Fraktionierung eines DNA-Präparates aus *A. tumefaciens*-Stamm 147

— Absorption bei 260 m μ (E_{260})
- - - Anthronreaktion (E_{630})

aufgetragenen DNA-Lösung (*Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147) in einer Konzentration von ca. 20 mg in 40 ml Puffer konnten wir die Trennung im präparativen Maßstab innerhalb von 3 h durchführen (Abb. 5). Von jeder einzelnen der insgesamt 48 Fraktionen wurde die UV-Absorption bei $260\text{ m}\mu$ (E_{260}) bestimmt und mit aliquoten Teilen die Anthronreaktion (s. oben) durchgeführt, deren kolorimetrische Messung bei $630\text{ m}\mu$ (E_{630}) erfolgte. Wenn man von der in der Nähe der Anode auftretenden Fraktion absieht, deren unspezifische UV-Absorption auf Zersetzungsprodukte des Puffers hindeutet, so kann man eine DNA- und eine Polysaccharidfraktion aufgrund ihrer spezifischen UV-Absorption bzw. positiven Reaktion mit Anthron nachweisen (Abb. 5).

Die zu den beiden Fraktionen gehörenden Einzelgläser wurden miteinander vereinigt, die Lösungen im Vakuum-Rotationsverdampfer eingeeengt, dann gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend mit Äthanol ausgefällt. Die in wenig Tris-Puffer mit pH 8,6 (s. oben) gelösten Fraktionen wurden auf ihre Einheitlichkeit geprüft und hierbei eine Mikroelektrophoreseapparatur nach ANTWEILER verwendet. Die Elektrophorese beider Fraktionen erfolgte bei 60 V und 0,3 mA und wurde im schlierenoptischen (PHILPOT-SVENSSON) Bild im aufsteigenden Schenkel der Küvette verfolgt (s. ANTWEILER 1952). Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, wandert die DNA als einheitliche Fraktion zur Anode (A), während die Polysaccharidfraktion keine Beweglichkeit zeigt und an der Übergangsstelle zwischen Analysenlösung und Puffer liegenbleibt (B). Wurden beide Fraktionen zu gleichen Teilen miteinander gemischt und dann in dieser Weise elektrophoretisch untersucht, so ließen sich beide wieder voneinander trennen. Dieser Befund spricht gegen eine mögliche Komplexbildung zwischen DNA und Polysaccharid.

Die Polysaccharidfraktion läßt nur in hoher Konzentration, d.h. in viskoser Lösung, eine UV-Absorption erkennen. Das in Abb. 7 abgebildete UV-Absorptionsspektrum ist gekennzeichnet durch eine starke Absorption im kurzwelligen Bereich ($< 230\text{ m}\mu$) und durch ein Maximum bei $270\text{ m}\mu$. Es kann angenommen werden, daß diese Polysaccharidfraktion frei von Nucleinsäuren ist. Ob die UV-Absorption eine Eigen-

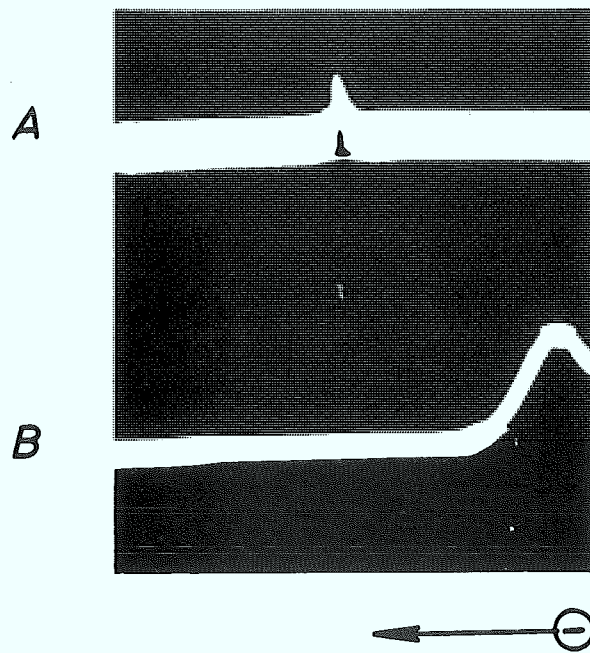


Abb. 6 Elektrophorese der DNA- bzw. Polysaccharidfraktion im ANTWEILER-Gerät, schlierenoptische Abbildung nach PHILPOT-SVENSSON, Tris-Puffer 8,6 60 V/0,3 mA. A : DNA; B : Polysaccharid.

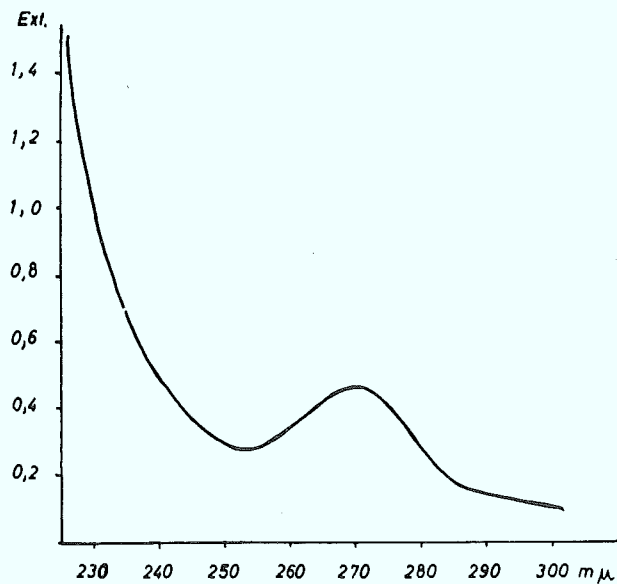


Abb. 7 UV-Absorptionsspektrum der Polysaccharidfraktion.

schaft des Polysaccharides selbst oder auf adsorbierte Stoffe zurückzuführen ist, wurde nicht untersucht.

Eine weitere Voraussetzung für die Transformation ist das Vorliegen der DNA in der geordneten Doppelhelix, wenn wir dabei die erwähnte molekulare Konfiguration thermisch denaturierter DNA mit biologischer Restaktivität (Abb. 2) unberücksichtigt lassen. Als Maß für den Ordnungszustand der DNA eignen sich besonders die thermische Denaturierung und die Reaktion der DNA mit Formaldehyd (s. S. 9).

Beim Erhitzen einer DNA-Lösung steigt die UV-Absorption, gemessen bei $260 \text{ m}\mu$, in charakteristischer Weise an (vergl. Abb. 8). Sie ist bedingt durch den Übergang von der Doppelhelix in das einsträngige, ungeordnete Knäuelstadium (MARMUR und DOTY 1962). Dieser Übergang erfolgt in einem engen Temperaturbereich. Der Mittelpunkt dieses thermalen Anstieges der UV-Absorption, der sog. T_m -Punkt, gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte der maximalen Extinktionszunahme (Hyperchromizität) erreicht wird. Der T_m -Punkt wird vielfach zur Charakterisierung einer DNA benutzt. Nach heutiger Kenntnis hängt der T_m -Wert außer von der Ionenstärke des Lösungsmittels nur noch vom Basenverhältnis der DNA ab. MARMUR und DOTY (1962) konnten die Linearität zwischen dem molaren Anteil der Basenpaare Guanin-Cytosin (G-C) und dem T_m -Punkt an zahlreichen aus verschiedenen Organismen gewonnenen DNA-Präparaten nachweisen. Es gilt die Beziehung:
$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\text{G-C}).$$
Hierin bedeutet (G-C) den prozentualen, molaren Anteil von Guanin + Cytosin an der Gesamtheit aller Basen der betreffenden DNA. Auf dieser Grundlage bietet sich die Möglichkeit, den G-C-Gehalt der DNA und damit deren Basenverhältnis zu bestimmen. Diese Anwendung der thermischen Denaturierung der DNA soll später näher beschrieben werden.

Bei unserer augenblicklichen Fragestellung dient der Verlauf der thermischen Denaturierung zur Demonstration der doppelsträngigen Donator-DNA.

Zu diesem Zweck wurde die DNA in $0,0025 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 + 0,005 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 + 0,001 \text{ M Titriplex III}$ (oder Äthylendiamintetraessigsäure)

gelöst (ca. 30 μ /ml). Dann wurde die DNA-Lösung in einer mit Deckel fest verschlossenen Quarzküvette in einem temperierbaren, an einen Ultrathermostaten angeschlossenen Küvettenhalter langsam erhitzt. Die Temperaturmessung erfolgte in der Vergleichsküvette mittels eines in den Deckel eingekitteten Thermometers. Sobald sich die betreffende Temperatur in der Küvette eingestellt hatte, wurde die E_{260} abgelesen und auf diese Weise die ganze Absorptions-Temperaturkurve kontinuierlich aufgenommen (vergl. Abb. 8). Die den jeweiligen Temperaturen entsprechenden E_{260} -Werte wurden auf die Absorption der DNA-Lösung bei Zimmertemperatur (100%) prozentual bezogen. Aus der Denaturierungskurve (vergl. Abb. 8) wurde der T_m -Punkt als 50% des maximalen Anstieges der Hyperchromizität bestimmt. Die Temperatur des T_m -Punktes wurde korrigiert (Eichthermometer). Die Wärmeausdehnung der Lösung blieb unberücksichtigt.

In Abb. 8 ist die von DNA aus dem Donator *A. tumefaciens* aufgenommene Denaturierungskurve wiedergegeben. Der steile Anstieg der Kurve wie die Höhe der Hyperchromizität demonstrieren die Doppelstrangnatur dieser DNA. Der T_m -Punkt liegt bei 73,4°C und entspricht einem molaren Gehalt an Guanin+Cytosin von 57% (s. Abschnitt C 3).

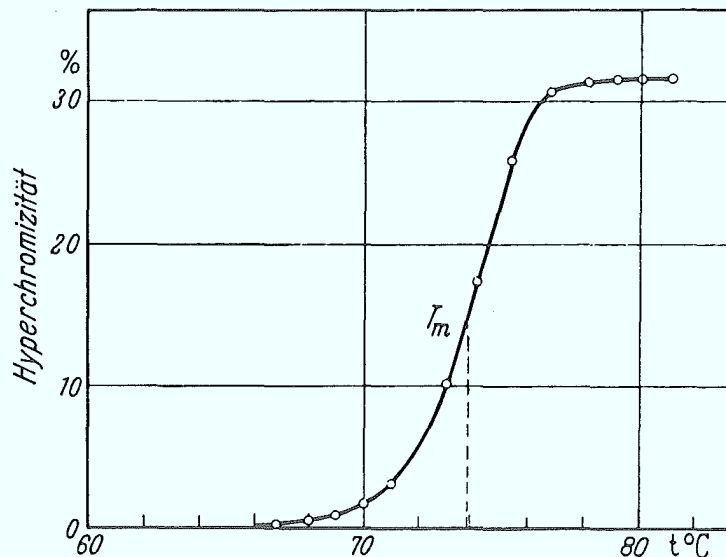


Abb. 8 Thermische Denaturierungskurve der DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147.

Eine Bestätigung für das Vorliegen einer doppelsträngigen DNA ist auch darin zu sehen, daß die DNA nach einer Inkubation in Gegenwart von 1% neutralisiertem Formaldehyd (1 h bei 37°C) weder eine Verschiebung des UV-Absorptionsspektrums in den längerwelligen Spektralbereich, noch einen hyperchromen Effekt zeigte (s. S. 9).

Als kleinstes Molekulargewicht einer transformierenden DNA geben LITT et al. (1958) 1×10^6 an. Um auch diese Voraussetzung zu sichern, nahmen wir größenordnungsmäßige Bestimmungen des Molekulargewichtes vor. Hierbei wurden DNA-Moleküle nach der Methode von KLEINSCHMIDT (1959) elektronenmikroskopisch abgebildet und aus der gemessenen Moleküllänge auf das Molekulargewicht geschlossen. In 1 M Ammoniumacetat gelöste DNA wurde mit Cytochrom C auf 0,25 M Ammoniumacetat im Langmuir-Trog gespreitet:

2 ml DNA-Lösung (50 μ /ml) werden mit 10 ml 1 M Ammoniumacetat vermischt, von dieser Lösung 1 ml mit 1 ml einer 0,04%igen Lösung von Cytochrom C in 1 M Ammoniumacetat kurz vor der Spreitung vereinigt, 0,25 ml hiervon mit einer Agla-Spritze über eine Ablauframpe langsam auf die Flüssigkeitsoberfläche im Langmuir-Trog (gefüllt mit 0,25 M Ammoniumacetat) appliziert. Nach 10 min wird der DNA-Protein-Film mittels eines Glasstabes vom Ende des Troges her komprimiert (als Indikator dienen vor der Spreitung in der Nähe der Auftragsstelle ausgestreute Talkumkörnchen). Dann fertigt man Präparate für das Elektronenmikroskop an, indem verschiedene Stellen des Oberflächenfilms mit je einem Objektträger (mit Formvar verstärkt und kohlebedampft) abgetupft, die nach Eintauchen in abs. Äthanol und danach in Isopentan an der Luft getrocknet und dann einer Schrägbedampfung unterworfen (Bedampfungswinkel $6 - 10^\circ$, Palladium) werden. Von den bei Primärvergrößerungen von 20 000 aufgenommenen Photos werden Negativbilder gemacht. Die Längenbestimmung der abgebildeten DNA-Fäden erfolgt an Vergrößerungen (Sekundärvergrößerungen: 70 000 bis 80 000) durch Abmessung von Einzelfäden (Abb. 9).

Die Ausmessungen von insgesamt 30 DNA-Fäden ergaben einen arithmetischen Durchschnittswert von $1,9 \mu$, die größten Längen betragen 4μ . Nach dem von LANG, KLEINSCHMIDT und ZAHN (1964) benutzten Näherungswert von $1,811 \times 10^{10}$ Molekulargewicht je Zentimeter vollständig dissoziierter DNA würden $1,9 \mu$ Fadenlänge einem Molekulargewicht von $3,4 \times 10^6$ und 4μ Länge einem von $7,2 \times 10^6$ entsprechen. In den Untersuchungen von MACHATTIE und THOMAS jr.



Abb. 9 Elektronenmikroskopische Aufnahme von DNA-Molekülen aus *A. tumefaciens* nach Spreitung mit Cytochrom C (KLEIN-SCHMIDT 1959). Schrägbedampfung mit Palladium, Negativbild. Primärvergrößerung 20 000 x, Endvergrößerung 62 000 x.

(1964) werden DNA-Moleküle (Lambda-Phagen) von $17,2\mu$ Länge einem Molekulargewicht von 33×10^6 zugeordnet. Auf DNA aus *A. tumefaciens* übertragen, ergibt sich ein mittleres Molekulargewicht von $3,6 \times 10^6$ und ein maximales von $7,6 \times 10^6$. Wenn man bedenkt, daß sich das DNA-Präparat aus einer Population verschieden großer Moleküle zusammensetzt, so wird deutlich, daß diese Größenangaben nur Schätzwerte sein können und keine Aussage über die prozentuale Beteiligung der einzelnen Größenklassen ermöglichen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß die DNA sterilisiert vorlag und entsprechend behandelt worden war (s. S. 19). Diese Prozeduren bringen natürlich die Gefahr einer Fragmentierung der Moleküle und somit einer Reduktion des mittleren Molekulargewichtes mit sich. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß wir bei Anwendung einer schonenden Präparationsmethode (BERNS und THOMAS jr. 1965) Moleküllängen der hier interessierenden DNA gemessen haben, die einem Molekulargewicht von ca. 25×10^6 entsprachen. Allerdings wurde sie nicht sterilisiert.

Aus dem Gesagten geht also hervor, daß die hier untersuchte Donator-DNA bezüglich ihres Molekulargewichtes durchaus den Anforderungen einer biologisch aktiven DNA entspricht. Um aber einen Einblick zu bekommen, wie weit der Sterilisierungsprozeß zu Verschiebungen im prozentualen Anteil der einzelnen Molekülgrößen führt, wurde jeweils ein DNA-Präparat vor und nach der Sterilisierung (s. S. 19) säulenchromatographisch miteinander verglichen. Zur Anwendung kam dabei die kürzlich von DAVILA, CHARLES und LEDOUX (1965 a, b) beschriebene Methode. Diese basiert auf Arbeiten von BENDICH et al. (1955) und besteht im Prinzip darin, daß DNA auf eine DEAE-Säule gebracht wird und durch aufeinanderfolgende Eluierung mit verschiedenen Lösungen entsprechend den Molekulargewichten fraktioniert wird:

Ein aus Whatman DEAE-Chromatographiepapier (DE 81) nach den Angaben von DAVILA et al. (1965) hergestellter und ausgewaschener Papierbrei wird in die "Säule" geschlämmt. Hierfür verwenden wir eine 100 ml Spritzflasche aus Plastik, deren Boden abgeschnitten und deren Ausfluß nach Entfernen des Spritzrohres mit Glaswatte zuge-

stopft wurde. Diese wird in ein Zentrifugenglas gestellt und in einer Horizontalzentrifuge bei ca. 600 x g zentrifugiert. In die trockene Cellulosemasse (ca 1 g) läßt man vorsichtig konzentrierte DNA-Lösung (2 mg DNA in 2 ml Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,0) einsickern. Dann wird die so beschickte "Säule" nacheinander mit je 15 ml der nachfolgend aufgeführten sechs Lösungen übergossen, jedesmal zentrifugiert, die Eluate quantitativ aufgefangen und entsprechend miteinander vereinigt und mit der jeweiligen Lösung in einem 50 ml Meßkolben zur Marke aufgefüllt. Die DNA-Konzentration jeder dieser sechs Fraktionen wird spektroskopisch durch die UV-Absorption (Differenz E_{260} minus E_{300}) bei einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt und als Absorptionseinheit ausgedrückt: $E_{260} - E_{300} \times \text{Volumen der Gesamtlösung (50 ml)}$.

Die verwendeten Lösungsmittel sind:

- Fraktion 1 : 0,001 M Phosphatpuffer (Sörensen), pH 7,0
- Fraktion 2 : 0,001 M Phosphatpuffer + 0,14 M NaCl
- Fraktion 3 : 0,001 M Phosphatpuffer + 0,5 M NaCl
- Fraktion 4 : 0,001 M Phosphatpuffer + 1,0 M NaCl
- Fraktion 5 : 0,2 M NH_3 + 2 M NaCl
- Fraktion 6 : M NaOH

Bei steigender Ionenstärke bzw. ansteigendem pH-Wert erfolgt so eine Fraktionierung der DNA entsprechend den zunehmenden Molekulargewichten.

Der Vergleich zwischen unbehandelter und behandelter (sterilisierter) DNA ließ nur geringfügige Unterschiede in den Eluierungsdiagrammen erkennen (Abb. 10).

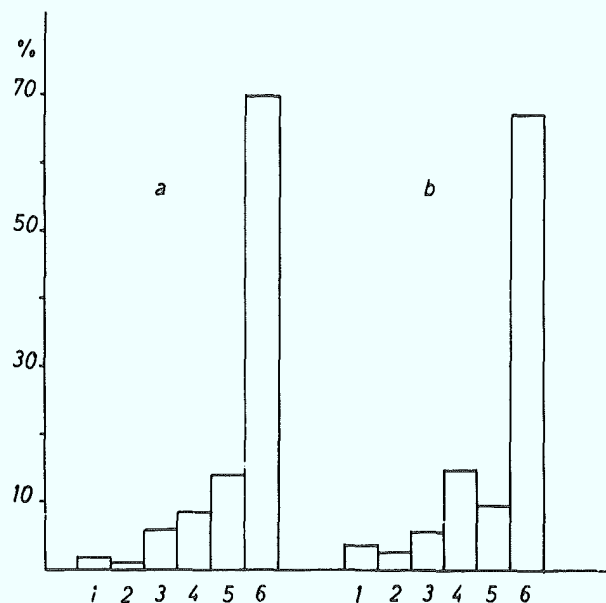


Abb. 10 Zentrifugale Fraktionierung von DNA aus *A. tumefaciens* an DEAE-Cellulose; a : unbehandelte DNA; b : sterilisierte DNA (s. S. 19). Ordinate : prozentualer Anteil der einzelnen Fraktionen (s. Text).

Wesentlich dürfte sein, daß in beiden Fällen der Anteil hochmolekularer DNA bei 70 % liegt. Wenn durch die Prozedur der Sterilisierung tatsächlich Veränderungen bezüglich der molekularen Zusammensetzung des DNA-Präparates verursacht werden, dann müßten sie in der Fraktion 6 erfolgen, die ihrerseits diese Verschiebungen nicht zu erkennen gibt. DAVILA et al. (1965b) haben die Sedimentationskonstanten von verschiedenen DNA-Präparaten bestimmt und aus ihnen das durchschnittliche Molekulargewicht berechnet. Nach ihren Angaben beträgt das mittlere Molekulargewicht der sechs Fraktionen : 500; 2000; 50 000; 500 000; 1×10^6 bzw. 5×10^6 . Damit würden die an den elektronenmikroskopisch abgebildeten DNA-Molekülen vorgenommenen Abschätzungen des Molekulargewichtes (s. S. 30) indirekt bestätigt werden. Interessant ist ferner, daß SRÖGL und LEDOUX in einer vorläufigen Mitteilung (s. DAVILA et al. 1965b, Fußnote S. 393) berichten, daß die Fraktionen 4,5 und 6 einer transformierenden DNA aus *Bacillus subtilis* biologisch aktiv sind. Damit scheint der Beweis erbracht zu sein, daß DNA-Moleküle bereits bei einem Molekulargewicht von 500 000 Transformationen herbeiführen können (vergl. dagegen LITT et al. 1958).

Die untersuchte Donator-DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 ist somit hinreichend chemisch und physikalisch charakterisiert, daß man von ihr Transformationseigenschaften erwarten kann.

3. Transformationsansatz und Selektion virulenter Transformanten

Bei den Transformationsversuchen wurden aus bereits dargelegten Gründen (s. S. 17) *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147 als DNA-Donator und *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C als Acceptor verwendet und dabei die Fähigkeit zur Induktion tumorartiger Wucherungen an den Versuchspflanzen als Selektionsmerkmal benutzt. Zur Vereinfachung wird im folgenden von St. 147 bzw. DNA-147 und St. C gesprochen.

Die Versuchsanstellung läßt sich somit formulieren:



(T = Transformanten)

Die Versuchsansätze wurden in folgender Weise durchgeführt:

Flüssigkeitskulturen von St. C in Mannit-Nährlösung (3 g Hefeextrakt; 1 g Mannit; 100 mg NaCl; 200 mg MgSO₄ · 7 H₂O; 500 mg K₂HPO₄; pH 7, dest. Wasser ad 1000 ml) wurden 24 h bei 28°C in sterilen, mit Kapsenberg-Kapseln verschlossenen Zentrifugengläsern (5 ml Nährlösung in Gläsern mit 12 cm³ Volumen) inkubiert, abzentrifugiert und das Bakteriensediment in einem sterilen anorganischen Medium (ME-A + TE-Lösung nach SCHWINGHAMER 1960) resuspendiert, 1 h bei 28°C gehalten, wieder abzentrifugiert, in 5 ml Mannit-Nährlösung aufgenommen und mit 1 ml steriler DNA-Lösung (s. S. 19) versetzt (DNA-Endkonzentration 200 µg/ml) und dieser Ansatz 4 h bei 30°C bebrütet. Nach Abzentrifugation und Suspendierung in sterilem Leitungswasser werden diese Kulturen sofort oder erst nach Weiterkultur in flüssigem Nährmedium für den Virulenztest verwendet.

Zur Kontrolle diene der Inaktivierungstest (vergl. S. 9) mit DNase: Ein Teil der für den jeweiligen Ansatz verwendeten DNA-Lösung wird mit DNase (ca. 1 mg DNase/ml, Desoxyribonuclease I, lyophil. rein, 30 000 Dornase-Einheiten/mg; Serva, Heidelberg) versetzt, in Gegenwart von 0,025 M MgSO₄ 2 h bei 37°C inkubiert und erst dann zum Acceptor (St. C) zugegeben.

Der Virulenztest erfolgte im wesentlichen an Stengeln von *Kalanchoë tubiflora* und an den Blättern von *Kalanchoë daigremontiana*, in einigen Fällen auch an den Stengeln von *Lycopersicon esculentum*, *Datura stramonium* und *Solanum laciniatum* (s. LIMBERK 1962) und an Wurzelscheiben von *Daucus carota*. Letztere wurden unter sterilen Bedingungen von gewaschenen und an der Oberfläche sterilisierten (1 h Einwirkung von gesättigter wäßriger Chlorkalklösung) Möhren nach Entfernung der verätzten, weißlichen Gewebspartien entnommen.

Die zu testenden Bakteriensuspensionen (s. oben) werden mittels einer Impföse auf künstlich gesetzte Wundstellen (Nadelstich oder Schabestellen mit Skalpell) der Pflanzenstengel oder Blätter bzw. auf die Oberfläche der Möhrenscheiben aufgetragen. Die beimpften Pflanzen werden eine Woche (Induktionsphase s. Abb. 1) bei hoher Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus gehalten, die Möhrenscheiben in Petrischalen auf feuchtem Filtrierpapier (Leitungswasser) bei Zimmertemperatur in diffusem Licht kultiviert. Meist lassen sich zwei Wochen nach Beimpfung der Pflanzen schon Aussagen über die Virulenz machen.

In Abb. 11a-c wird ein solcher Versuch an *Solanum laciniatum* veranschaulicht.

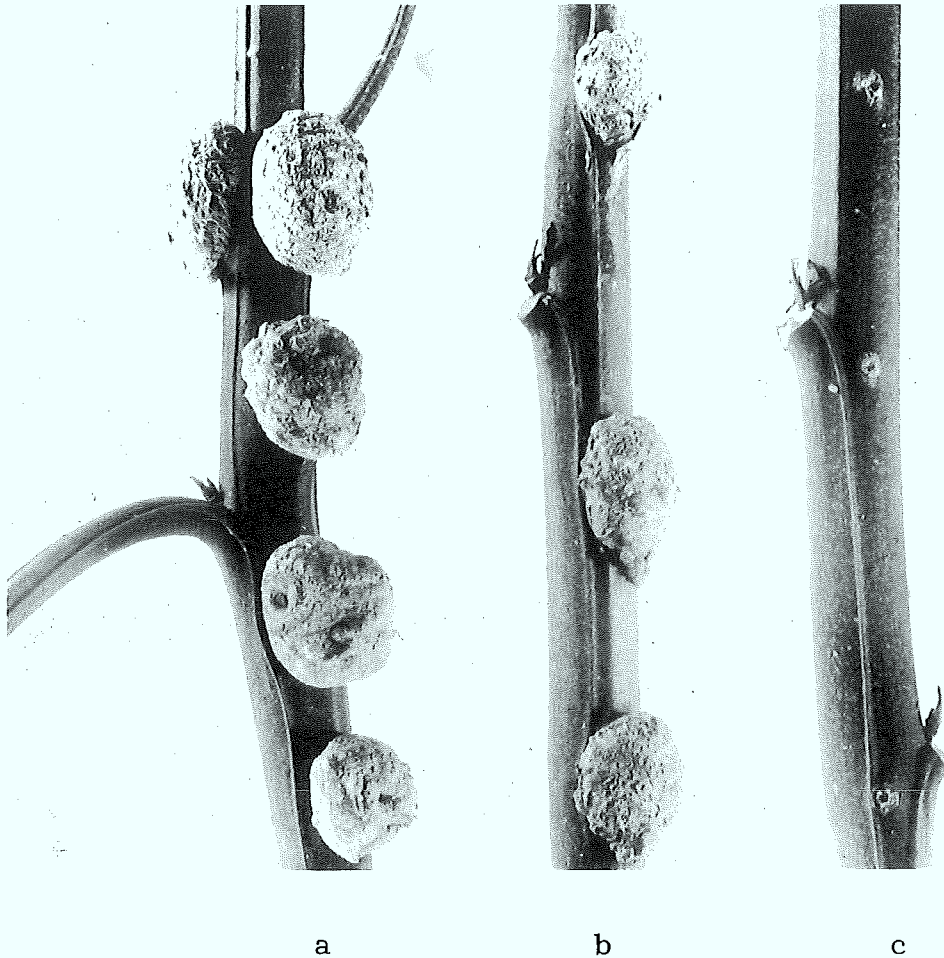


Abb. 11 a: Tumoren ("crown gall") an *Solanum laciniatum*, induziert durch *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147 (St. 147);
b: tumorartige Wucherungen an *Solanum laciniatum*, hervorgerufen durch Stamm Cx, der durch Transformation aus *Rhizobium leguminosarum* hervorgegangen ist (Donator: *A. tumefaciens*-Stamm 147, Acceptor: *Rh. leguminosarum*-Stamm C)
c: Keine Tumorbildung nach Beimpfung mit *Rh. leguminosarum* (St. C). Erklärung im Text.

Wir isolierten virulente Bakterien aus den Stengelwucherungen (Abb. 11b) in folgender Weise: Tumortragende Stengelabschnitte werden gründlich gewaschen, in 75%iges Äthanol übergeführt, 10 min in einer wäßrigen Lösung von Merthiolat (1 : 10 000 g/v) oder 5 min in 0,1% Sublimat gehalten, anschließend kurz in 30%igem Wasserstoffperoxyd getaucht und mehrmals mit sterilem Wasser ausgewaschen. Die so behandelten Gewebe werden mit einer sterilen Pinzette zerquetscht und

der Preßsaft in flüssiges Mannit-Nährmedium (s. S. 33) getropft. Nach Inkubation (48 h bei 28°C) werden Ausstriche auf Mannit-Agar gemacht und nach Bebrütung aus einzelnen Kolonien Reinkulturen im Koch'schen Plattenverfahren gewonnen. Die Oberflächensterilität der behandelten Gewebe wird vor dem Zerquetschen geprüft, indem man sie auf Mannit-Agar auslegt oder in Nährlösung einbringt, 24 h dort bebrütet und dann wie beschrieben weiterbehandelt. Die Platten bzw. Röhrchen werden vier Tage bei 28°C inkubiert und auf Fremdinfectionen untersucht.

Um sicher zu sein, daß die entstehenden tumorartigen Auswüchse (Abb. 11b) an den Testpflanzen tatsächlich ihre Ursache nur in dem jeweils applizierten Transformationsansatz haben, wurden entsprechende Kontrollversuche durchgeführt. Diese lassen sich durch folgende Feststellungen wiedergeben:

1. DNA-147 war steril (s. S. 19).
2. Sie induzierte in keinem Falle nach Applikation auf die Wundstellen der Testpflanzen tumorartige Wucherungen, auch dann nicht, wenn die DNA-Lösung vorher mit steril filtriertem Preßsaft verwundeter, aber nicht beimpfter Pflanzenstengel (MANIGAULT und STOLL 1958) inkubiert wurde.
3. Der Acceptor, d.h. *Rh. leguminosarum* (St. C), ist avirulent in bezug auf Tumorbildung.
4. Die Behandlung der DNA-147 mit DNase (s. S. 9 und 33) vor Inkubation mit dem Acceptor führte zur Inaktivierung des transformierenden Prinzips. Pflanzen, die entsprechend diesen Punkten behandelt wurden, bildeten keine Tumoren (vergl. Abb. 11c).

Ein aus Stengelgeschwulsten an *Kalanchoë tubiflora* (Abb. 12) isolierter Bakterienstamm (s. S. 34), dessen Virulenz durch den Pathogenitätstest und durch mehrmalige Pflanzenpassage bewiesen war, wurde herausgegriffen und bei den weiteren Untersuchungen verwendet. Er trägt die Bezeichnung Stamm Cx (Abkürzung St. Cx) und wird als Transformant des Ausgangsstammes C aufgefaßt. Seit seiner Isolierung im Frühjahr 1963 in ständiger Kultur gehalten, behielt er zwei Jahre seine

volle Virulenz bei.



Abb. 12 Stengelwucherungen an *Kalanchoë tubiflora*, induziert durch den transformierten Stamm Cx.

Eine allgemeine Erscheinung bei den beschriebenen Transformationsversuchen ist die Beobachtung, daß die nach Aufimpfen eines Transformationsansatzes auf die Wundstelle entstehenden Geschwulste relativ klein sind und sich wesentlich langsamer entwickeln als nach Inokulation mit lebenden Zellen des DNA-Donators St. 147 (vergl. Abb. 11a und 11b). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Transformationsrate sehr niedrig liegt (s. Kapitel IV) und es sich hier um eine Mischinfektion handelt. Es ist durchaus denkbar, daß wenige virulente Transformanten in Gegenwart vieler unveränderter Acceptorzellen im Transformationsansatz nicht die volle Virulenz entfalten können. Ein Beweis für diese Annahme ist darin zu sehen, daß Reinkulturen von St. Cx

Tumoren hervorrufen können, die an Größe denen von St. 147 nahekommen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß unter kritischer Berücksichtigung möglicher Fehlerquellen die vorliegenden Ergebnisse eine Übertragung der Virulenz von *A. tumefaciens* auf *Rhizobium leguminosarum* durch genetische Transformation sehr wahrscheinlich machen. Beimpfungen der Pflanzenstengel mit reiner DNA-147 (s. S. 18) verursachten in keinem Falle Wucherungen. Diese Feststellung spricht zunächst für die Sterilität der DNA, darüber hinaus für die Abwesenheit lebender, virulenter Donatorzellen. Sie macht aber auch Viren als "tumorinduzierendes Prinzip" (TIP) unwahrscheinlich. Versuche zur zellfreien Tumorinduktion (s. Punkt 2 S. 35) im Sinne von MANIGAULT und STOLL (1958) verliefen immer negativ. Offensichtlich erfüllen nur einige der getesteten *Rhizobium*-Stämme die Voraussetzungen eines Acceptors für die unter gleichen Bedingungen gebotene DNA. Der Einwand, daß eine Infektion durch *Agrobacterium tumefaciens* aus der Luft eine Transformation vortäusche, ist ebenfalls unwahrscheinlich. Transformationsansätze mit DNA-147 wurden mit anderen *Rhizobium*-Stämmen (z. B. *Rh. japonicum*; *Rh. lupini* u. a.) zur gleichen Zeit mit demselben DNA-Präparat und Verwendung gleichartiger Testpflanzen bei gleichen Kulturbedingungen (die Pflanzen standen gemischt!) im Gewächshaus gemacht. Es reagierten nur die mit dem Ansatz DNA-147 + St. C inokulierten Pflanzen. Die verletzten, aber nicht beimpten Kontrollpflanzen (Abb. 11c) müßten im Falle der diskutierten Fremdinfection ebenfalls, wenigstens in einigen Fällen Tumorbildungen aufweisen. Diese traten jedoch nicht auf. Aber auch die Tatsache, daß Ansätze zur Transformation nur bei einigen der geprüften *Rhizobium*-Stämme virulente Formen ergaben und diese immer nur dann auftraten, wenn mit steriler DNA des Donators inkubiert wurde, spricht gegen das Auftreten virulenter Spontanmutanten der Acceptoren.

Wenn auch alle bisher angeführten Argumente für eine genetische Transformation sprechen, so sind doch keine Aussagen über den Transformationsvorgang selbst möglich. Bedingt durch die Schwierigkeiten

eines quantitativen Nachweises virulenter Bakterien sind vorerst Untersuchungen über die Transformationsrate virulenter Transformanten und damit auch die empirische Ermittlung der Bedingungen für eine hohe Kompetenz der Acceptorzellen (s. S. 11 ff.) nicht möglich (s. Kapitel IV).

4. Nachweis von Tumoreigenschaften

In den bisher beschriebenen Untersuchungen war die Rede von "tumorartigen Auswüchsen, Geschwülsten" u. ä. als Umschreibung für die Gebilde, die durch transformierte Rhizobiumzellen an den Testpflanzen induziert werden. Damit sollte ausgedrückt werden, daß der äußere Habitus dieser Bildungen noch nicht dazu berechtigt, sie als echte "crown galls" zu bezeichnen. Tatsache ist, daß die durch St. Cx an verschiedenen Testpflanzen hervorgerufenen Geschwulste sich zwar langsamer entwickeln, jedoch weder äußerlich noch bezüglich der Lebensdauer von den echten Tumoren des Stammes 147 unterscheiden. Solange nicht alle für Tumoren geltenden Voraussetzungen wie Transplantierbarkeit, Wachstumsautonomie sowie cytologische und histologische Charakteristika (s. S. 2) nachgeprüft sind, können die von St. Cx induzierten Wucherungen zunächst nur mit Vorbehalt als Tumoren bezeichnet werden.

Die Autonomie der in Tumorzellen umgewandelten normalen Zellen bleibt erhalten, wenn das Tumorgewebe transplantiert (Pfropfung) oder in Gewebekultur gehalten wird. Transplantationen wie Gewebekultur setzen aber in jedem Falle bakterienfreies Gewebe voraus. Die Möglichkeit, durch Hitzebehandlung (46-47°C) des Tumorgewebes die Abtötung der virulenten Bakterien herbeizuführen, ohne dabei das Gewebe zu schädigen, wurde von BRAUN (s. BRAUN und STONIER 1958) an *Vinca rosea* mit Erfolg angewandt. Es war aber nicht zu erwarten, daß die bei unseren Versuchen benutzten Pflanzen (*Kalanchoë*, *Lycopersicon* etc.) eine gleiche Hitzeresistenz aufweisen wie die tropischen *Vinca*-Arten.

Daher versuchten wir, durch Behandlung mit verschiedenen Antibiotica die durch *A. tumefaciens* wie durch den Transformanten St. Cx hervorgerufenen Gewebewucherungen bakterienfrei zu bekommen, um sie dann für Pfropfungsexperimente zu verwenden oder in Gewebekultur zu nehmen. Letztere böte die Möglichkeit, den Grad der Umwandlung in echte Tumorzellen durch Kultur auf einfachen bzw. komplettierten Nährböden zu bestimmen wie BRAUN erstmalig an Tumorgewebe von *Vinca rosea* zeigen konnte (BRAUN und STONIER 1958). Für unsere Versuche wurde insbesondere Streptomycin (GAUTHERET 1959) für diesen Zweck verwendet. Jedoch schlugen alle Versuche fehl, da offensichtlich das pflanzliche Gewebe zu sehr in Mitleidenschaft gezogen wurde. Dagegen scheint die Anwendung von Vancomycin, einem von *Streptomyces orientalis* produzierten (McCORMICK 1955) Antibioticum, aussichtsreich zu sein. BOYLE und PRICE (1963) wiesen nach, daß Vancomycin bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml von Tomatenpflanzen toleriert wird und, während der Induktionsphase (s. Abb. 1) zugegeben, die Bildung von Tumoren verhindert. Auf Vancomycin sei hier besonders hingewiesen, da es nach unserer Meinung die Möglichkeit zu bieten scheint, durch Abtötung der Bakterien zu beliebigen Zeitpunkten in den Prozeß der Tumorinduktion einzugreifen. Diesem experimentellen Weg könnte ähnliche Bedeutung zukommen wie die leider nur beschränkt anwendbare Hitzeabtötung virulenter Bakterien, wie im Falle *Vinca rosea*. Eigene Voruntersuchungen deuten auf eine derartige Anwendungsmöglichkeit hin. Allerdings sind die an verschiedenen Objekten erhaltenen Befunde z. Zt. noch uneinheitlich. Insbesondere ist hierbei zu klären, wieweit Vancomycin die RNA-Synthese in der Pflanze wie im Bakterium hemmt (Hinweise der Herstellerfirma Eli Lilly, Gießen).

Da die Voraussetzungen für die Durchführung von Transplantationen und die Anlage von Gewebekulturen noch nicht gegeben waren, blieb nur noch der cytologische und histologische Vergleich mit echten "crown-gall"-Tumoren. Im folgenden soll der histologische Aufbau ausgewachsener Stengelwucherungen (St. Cx) nur soweit untersucht werden, als er zur Charakterisierung von Tumorgewebe notwendig erscheint. Es kann

daher nicht auf die zahlreichen histologischen Arbeiten an Wurzelhalsgallen eingegangen werden (BRAUN und STONIER 1958; BOPP und LEPPLA 1964). Auch wurde auf histogenetische Analysen der tumorartigen Gebilde verzichtet. Es bestand bei den folgenden Betrachtungen lediglich die Absicht, den Aufbau der durch St. Cx induzierten Stengelwucherungen an *Kalanchoë daigremontiana* mit dem echter Tumoren (*A. tumefaciens*) zu vergleichen. So bot sich ein Vergleich mit den Befunden an, die BOPP und LEPPLA (1964) kürzlich an Pflanzenstengeln von *Kalanchoë daigremontiana* gemacht haben.

An Stengeln von *Kalanchoë daigremontiana* durch Beimpfen mit St. Cx induzierte Wucherungen wurden nach drei Wochen mit den entsprechenden Stengelstücken abgeschnitten und mit dem Fixierungsgemisch nach HELLY (s. BAKER 1960; S. 62) fixiert (4 Tage), mit Äthanol (50% + 2% Schwefelsäure; 70% + 0,5% g/v Jod) ausgewaschen und über die Äthanolreihe in Butanol übergeführt und dann in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte (10 μ dick), in der üblichen Weise über Xylol in Wasser zurückgeführt, wurden nach den Angaben von KULL (s. ROMEIS 1948, S. 234) mit Säurefuchsin-Anilinwasser (6 min) und anschließend mit Toluidinblaulösung (6 min) gefärbt.

Das in Abb. 13 gezeigte Gesamtbild eines Querschnittes durch eine Stengelwucherung setzt sich aus mehreren Teilaufnahmen zusammen, die entsprechend miteinander kombiniert wurden. Als Anhalt für diese Übersicht dient Abb. 14, in der die Lage der verschiedenen Zell- bzw. Gewebstypen schematisch wiedergegeben wird. Als Folge der Infektion des Pflanzenstengels mit dem Transformanten St. Cx erfolgen Zellteilungen in der Stengelrinde, die in zunehmendem Maße ihre Orientierung zum Wundrand verlieren (s. S. 4) und zur Entstehung des hier abgebildeten Gewebekomplexes führen. Wie in Abb. 13 deutlich wird, stellt sich das Tumorgewebe zunächst als eine Ansammlung kleiner Zellen dar. Dieses wird besonders augenfällig, wenn man die isodiametrischen Parenchymzellen im Stengelmark (1) und in der unveränderten Rinde (2) gegenüberstellt. Nach den Untersuchungen von BOPP und LEPPLA (1964) nehmen Sproßtumoren ihren Anfang in der Stengelrinde.



Abb. 13 Querschnitt durch eine Stengelwucherung bei *Kalanchoë daigremontiana*, hervorgerufen durch St. Cx.
1 = Markparenchym des Stengels; 2 = Rindenparenchym;
3 = Übergang von Rindengewebe in Tumorgewebe;
4 = Tumor-"Rinde"; 5 = Holzparenchym und Tumorholz
(vergl. Abb. 14).

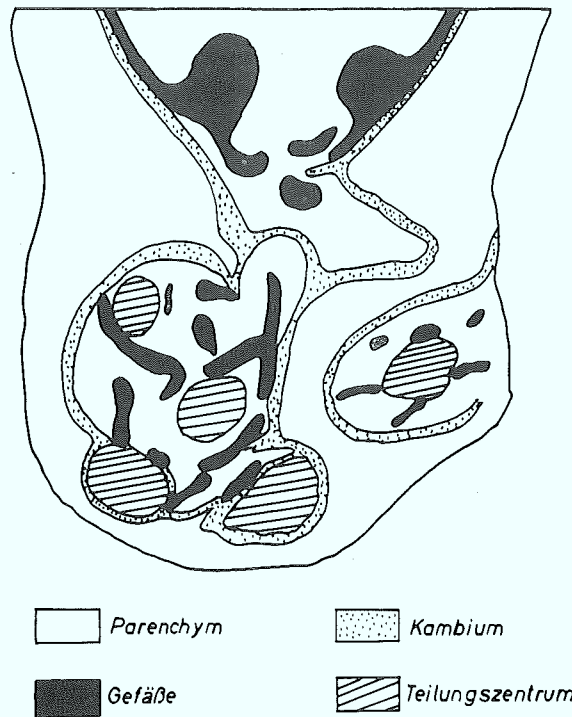


Abb. 14 Schematische Übersicht über den histologischen Aufbau des Stengeltumors von Abb. 13

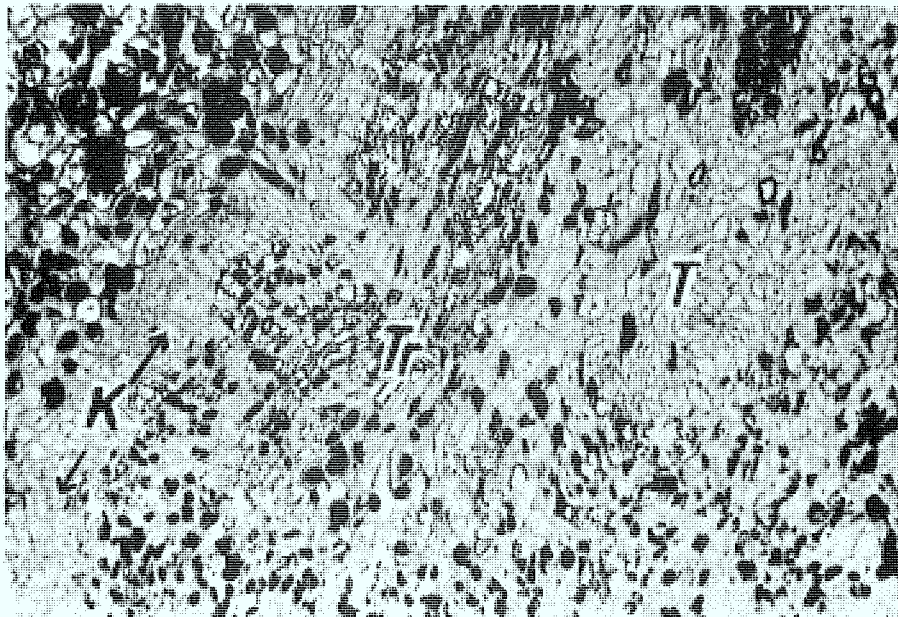


Abb. 15 Ausschnitt aus dem Tumorgewebe.
K = Kambiumstrang; T = Teilungszentrum; Tr = Tracheiden
und langgestreckte Zellen. Vergrößerung ca. 60 x.

Der Übergang von normalen Rindenzellen in das Tumorgewebe (3) wird in einer Zone sich teilender Rindenzellen deutlich. Die Oberfläche der Wucherung wird von einer "Rinde" (4) umgeben, die aus parallel zur Oberfläche angeordneten Zellen besteht und Ähnlichkeit mit einem Periderm hat. Das Tumorgewebe wird von Kambiumsträngen durchzogen, die z.T. mit dem Kambium des Leitbündelringes im Pflanzenstengel in Verbindung stehen. Der Verlauf dieser Stränge läßt sich im histologischen Bild anhand der typischen Zellstapel (Abb. 15) gut verfolgen und ist im Schema (Abb. 14) dargestellt. Langgestreckte Zellreihen sind zu erkennen (Abb. 15), die häufig zu Tracheiden differenziert sind und - wie in Abb. 13 zu erkennen ist (5) - sich bis zum achsialen Leitbündelring hinziehen. So wird das Gewebe mit einem Netz von Tracheiden durchsetzt. Im Schema (Abb. 14) sind nur die im histologischen Schnitt gehäuft auftretenden Tracheiden berücksichtigt. Teilungszentren, geballte Zellen (BOPP et al.), liegen verstreut im Gewebe (s. Abb. 14 und 15) und nehmen einen großen Teil des Tumors ein. Sie entstehen nach BOPP am Ende von Tracheidensträngen. Diese Lagebeziehung kann man in Abb. 15 erkennen. Die im Schema (Abb. 14) mit "Parenchym" bezeichneten Gewebebereiche sind Zellen, die sich unabhängig von ihrer Größe (s. oben) weder eindeutig als zum Kambium, noch zu den Teilungszentren oder zu den in Tracheiden übergehenden langgestreckten Zellen zuordnen lassen. An der Basis des Tumors, d.h. stengelwärts, kommt es zur Differenzierung von Gefäßen (Tumorholz) und Holzparenchym (5).

Somit stellt sich das hier in seinem histologischen Aufbau beschriebene Gebilde dar als ein "organisierter" Tumor im Sinne von KUPILA (1958). Ein Vergleich mit den anatomischen Untersuchungen von BOPP und LEPPLA (1964) an echten Tumoren derselben Pflanzenart läßt im wesentlichen eine Übereinstimmung mit dem hier untersuchten Gewebe erkennen. Angesichts dieser Tatsache kann die Berechtigung abgeleitet werden, die durch den transformierten Bakterienstamm Cx hervorgerufenen Geschwulste als echte Tumoren zu bezeichnen. Dieses gilt allerdings mit der Einschränkung, daß Transplantation und Verhalten

in der Gewebekultur (s. oben) zur weiteren Sicherung noch herangezogen werden müssen.

Die Feststellung von BOPP und LEPPLA (1964), daß sich das Markgewebe der Pflanze nicht an der Tumorbildung beteiligt, sondern diese ausschließlich vom Kambium, Leitbündel und Rindenpartien bestritten wird, findet ihre Bestätigung in Abb. 16. Wir dekapitierten Pflanzen von *Kalanchoë tubiflora* und infizierten die Schnittflächen mit St. Cx. Unter starker Bildung von Adventivwurzeln entstanden endständige Tumoren. Ein Längsschnitt durch die obere Stengelpartie (Abb. 16) demonstriert die besagte Feststellung. Übrigens ist die Bildung von Adventivwurzeln wie im vorliegenden Fall an *Kalanchoë* nur eine Begleiterscheinung der Tumorbildung. Veränderungen im Wuchsstoffhaushalt der Wirtspflanze dürften die Ursache hierfür sein, nicht jedoch die virulenten Bakterien selbst (BOPP et al. 1964). Wie ferner ein Vergleich der Abb. 11a und 12 ergibt, ist der Habitus der an verschiedenen Pflanzen mit dem gleichen Bakterienstamm hervorgerufenen Tumoren verschieden. An *Solanum laciniatum* entstehen Gebilde mit runzeli-ger Oberfläche (Abb. 11a), während an *Kalanchoë* glatte glänzende Tumoren wachsen. Diese Beobachtung dokumentiert, in welchem Maße die Pflanze Einfluß auf die Ausbildung der Tumoren hat. Sucht man nach möglichen Unterschieden in der Tumorbildung bei *A. tumefaciens*-Stamm 147 und St. Cx, so ist, abgesehen von der Größe der Neoplasmen, keine augenfällige Differenz festzustellen. Es sei allerdings erwähnt, daß bei unseren Versuchsbedingungen sich ein Unterschied in der Ausbildung von Teratomen ergab. Hierbei infizierten wir dekapitier-te Pflanzen (*Kalanchoë tubiflora*) mit *A. tumefaciens* (St. 147) oder mit St. Cx. Im Falle von St. Cx traten immer nur normale endständige Tumoren auf, wie in Abb. 16 gezeigt wird. Dagegen setzte nach Beimpfung mit St. 147 oft eine Teratombildung ein (Abb. 17), d.h. die ursprünglich auftretenden Tumoren lassen die Tendenz zu "normalem" Wachstum erkennen, indem sie Blättchen und - wie in Abb. 17 zu erkennen ist - teilweise ganze Pflänzchen bilden. Da aber die Bedingungen für die Entstehung solcher Organoide nicht bekannt sind, ist

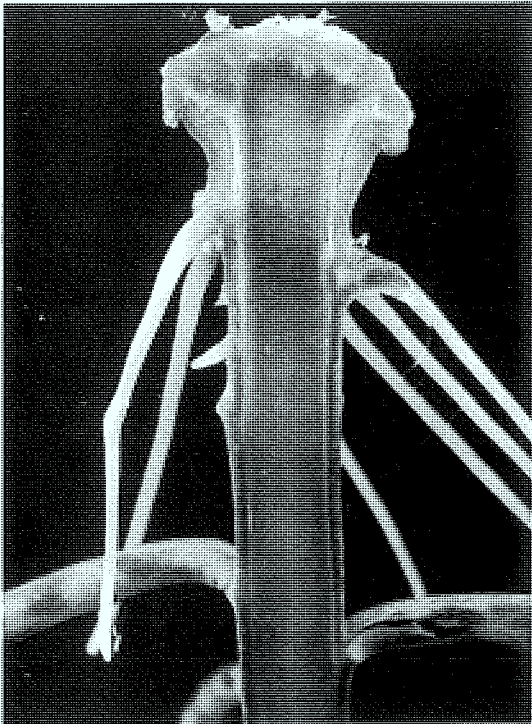


Abb. 16



Abb. 17

Abb. 16 Längsschnitt durch einen endständigen Tumor an *Kalanchoë tubiflora*, induziert durch St. Cx. Das Stengelmark ist nicht an der Tumorbildung beteiligt. Man beachte die Adventivwurzeln.

Abb. 17 Übergang eines endständigen Tumors (A. tumefaciens-St. 147) in ein Teratom. Die Adventivwurzeln wurden entfernt.

es fraglich, ob diese Beobachtung ein echtes Unterscheidungsmerkmal zwischen St. 147 und St. Cx ist.

Als ein sehr negatives Differenzierungsmerkmal des Transformanten gegenüber St. 147 stellte sich allerdings später heraus, daß St. Cx in seiner Virulenz merklich nachließ (s. S. 34). Nach nahezu zwei Jahren fielen Virulenzteste mit St. Cx nur noch schwach aus. Dieser Befund

geht aus Abb. 18 hervor. Hierbei wurden Sektoren der gleichen Möhrenscheibe mit St. 147, mit St. Cx infiziert bzw. blieben als Kontrolle unbeimpft. Dadurch war die Gewähr für gleichartiges Pflanzenmaterial gegeben.

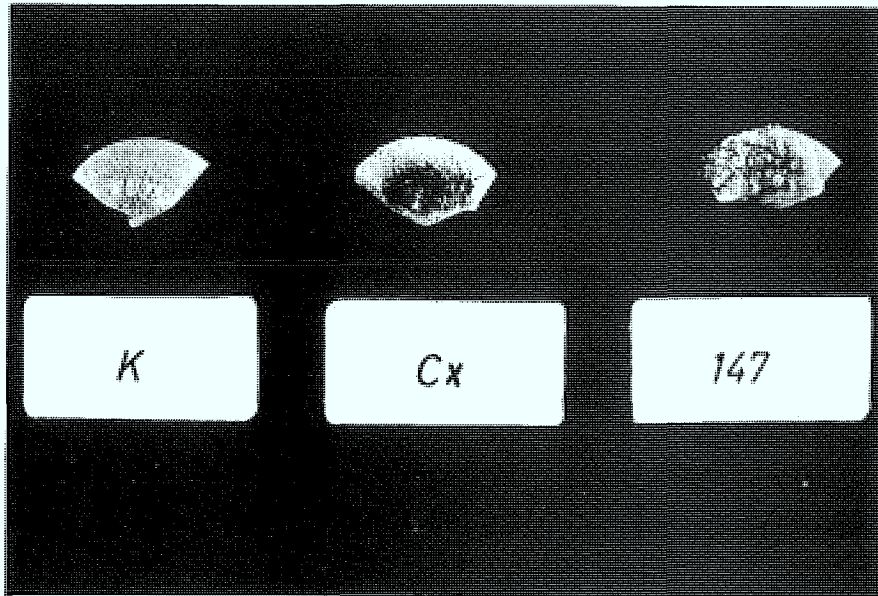


Abb. 18 Virulenztest an Sektoren von Möhrenscheiben.
K = unbeimpfte Kontrolle; Cx = infiziert mit dem transformierten Stamm Cx; 147 = beimpft mit *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147.

Diese Virulenzschwächung kann ihre Ursache darin haben, daß unbekannte Faktoren im Nährboden hierfür verantwortlich sind. Wenngleich von einigen Aminosäuren bekannt ist, daß sie eine Reduktion der Virulenz verursachen, so ist damit die Existenz unbekannter Stoffe mit gleicher Wirkung nicht ausgeschlossen (s. S. 6 ff.). Wieweit die offenkundig gewordene Herabsetzung des Virulenzgrades bei St. Cx reversibel ist, kann zur Zeit nicht entschieden werden.

5. Bildung von Wurzelknöllchen

Die bis jetzt beschriebenen und besprochenen Untersuchungen machen es sehr wahrscheinlich, daß St. Cx durch Transformation aus dem Acceptor *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C hervorgegangen ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den durch St. Cx induzierten Stengelwucherungen um Tumoren handelt, die in ihrem histologischen Aufbau mit echten "crown-gall"-Tumoren vergleichbar sind. Es erhebt sich nun die Frage, wieweit die genetisch manifest werdende Fähigkeit zur Tumorinduktion mit den ursprünglichen genetischen Eigenschaften des Acceptors (St. C) konkurriert. Besonders interessiert hierbei die Eigenschaft der Knöllchenbildung. Wurzelknöllchen bezeichnet man bekanntlich dann als effektive, wenn in ihnen eine symbiontische Stickstoffassimilation erfolgt (s. S. 1). Es ist bekannt, daß Wirtspflanze und Bakterium im gegenseitigen Gleichgewicht stehen (Allelo-Parasitismus; SCHAEDE 1962), das jedoch bei Veränderung eines oder beider Partner aufgehoben und dadurch eine effektive Stickstoffassimilation unterbunden wird. Es kann dann noch zur Knöllchenbildung ohne Stickstoffbindung kommen. Man bezeichnet solche Knöllchen als ineffektive. Eine weitere Folge kann sein, daß die Pflanze gegen die Infektion mit Rhizobien resistent wird und dann auch keine Knöllchenbildung stattfindet. So wies z.B. NUTMAN (1949) nach, daß die Resistenz einer Linie von Rotklee gegen eine *Rhizobium*infektion durch ein homozygot vorliegendes rezessives Gen (r) und einen cytoplasmatischen Faktor (σ) bestimmt wird. Bei Sojamutanten wird dagegen die Resistenz nur von einem rezessiven Gen der Wirtspflanze ohne cytoplasmatische Komplikationen determiniert (s. bei NUTMAN 1965, S. 1357).

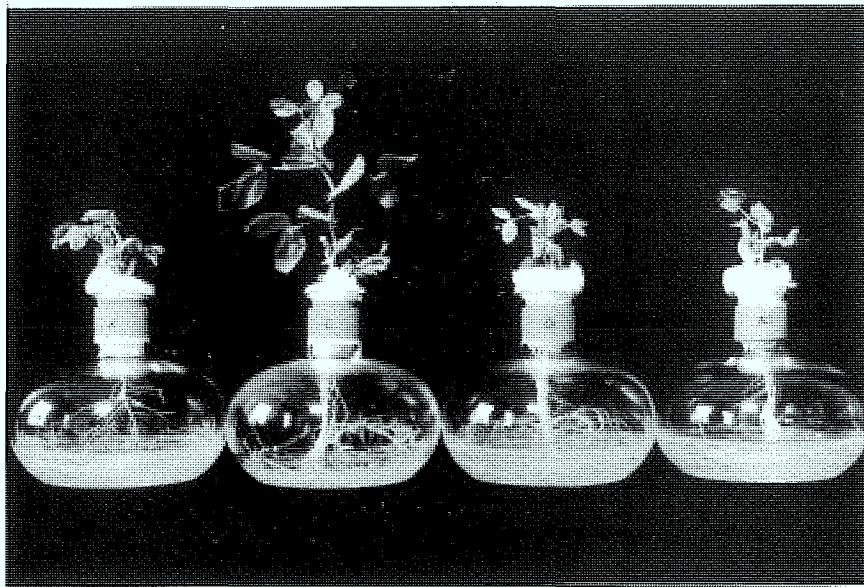
Da St. Cx als genetisch verändertes *Rhizobium* aufgefaßt werden kann, ist nicht anzunehmen, daß dieser Bakterienstamm die Fähigkeit zur effektiven Nodulation in gleicher Weise besitzt wie sein Ausgangsstamm (St. C), es ist aber auch nicht auszuschließen.

Dieser als genetischer Acceptor verwendete Rhizobium-Stamm wurde ursprünglich aus Wurzelknöllchen von *Pisum sativum* (Sorte "Kleine Rheinländerin") isoliert (s. S. 17). Wir führten daher mit Pflanzen der gleichen Erbsensorte Knöllchenteste durch, wobei steril angezogene Pflanzen in stickstofffreier Nährlösung in Gegenwart der zu prüfenden Bakterien kultiviert wurden:

Die Sterilisation trockener Erbsen erfolgt durch Behandlung mit 70%igem Äthanol unter Zusatz von etwas Laurylsulfat, mit 0,1% Sublimat (10 min) und nach Auswaschen mit Bromwasser (1 ml Brom + 10 ml Äthanol + dest. Wasser ad 100 ml) ebenfalls 10 min. Nach gründlichem Spülen läßt man die Samen 2 Tage auf feuchtem Filtrierpapier in sterilen Petrischalen vorkeimen und überführt sie dann in sterile Keimröhrchen nach RUDIN (1956). Die Keimwurzeln tauchen dabei in S_B -Lösung (SCHWINGHAMER 1960) ein. Nach 5-6 Tagen sind die Pflanzen S_B so groß, daß sie mit steriler Watte am Wurzelhals umwickelt in Fernbachkolben umgesetzt werden können, die mit N-freier S_B -Lösung und Zusätzen nodulationsfördernder Stoffe, wie Kobaltsalzen und meso-Inosit (RAGGIO und RAGGIO 1962), beschickt sind. Nach 5 Tagen werden die Kolben mit Suspensionen von *A. tumefaciens*-Stamm 147, bzw. St. Cx oder mit *Rh. leguminosarum*-Stamm C beimpft. Kontrollen bleiben unbeimpft. Die Kultur der Pflanzen erfolgte in einem belüfteten Lichtthermostaten bei 20°C im 12-Studentag (Leuchtstoffröhren Typ Osram-L 20 W/20, 10 Röhren mit einem Zwischenabstand von je 2 cm, Pflanzen in etwa 35 cm Abstand von der Lichtquelle) bei ca. 5000 Lux.

Das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe, bei der je 10 Pflanzen pro Ansatz verwendet wurden, ist in Abb. 19 demonstriert.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen konnten wir bereits 8 - 10 Tage nach Beimpfung mit St. C die typischen Wurzelknöllchen erkennen (Abb. 20 und 23). Zu diesem Zeitpunkt ließen sich an den Pflanzenwurzeln, die in Gegenwart von St. Cx oder St. 147 kultiviert wurden, enganliegende Schleimhäute feststellen (Abb. 21 und 22), unter denen oder in deren Nähe später, d.h. etwa 20 Tage nach erfolgter Beimpfung, Anschwellungen der Wurzeln oder unregelmäßig gestaltete "Knöllchen" zu beobachten waren. In Abb. 24 sind einige dieser Formen abgebildet. Sie wurden sowohl von St. Cx, als auch von St. 147 verursacht und traten regelmäßig auf. Unbeimpfte Kontrollpflanzen waren immer frei von diesen Wurzelbildungen. Bei späteren Untersuchungen verwendeten wir Saatgut der Sorte "Kleine Rheinländerin" neuerer



K C Cx 147

Abb. 19 Knöllchentest an *Pisum sativum* (Sorte "Kleine Rheinländerin"): K = Kontrolle ohne Beimpfung; C = *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C; Cx = transformierter *Rhizobium*-Stamm; 147 = *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147. Nur nach Inokulation mit St. C effektive Nodulation.

Ernten und konnten hierbei keine "Pseudoknöllchen" an den Wurzeln beobachten. Nur St. C führte zur Bildung normaler Wurzelknöllchen (Abb. 20 und 23). Auf diese Feststellung sei schon hier hingewiesen, da sie bei der Frage nach den Ursachen der "Pseudoknöllchen" eine wichtige Rolle spielt (s. unten).

Es ist zunächst festzustellen, daß nur St. C an Erbsenwurzeln eine effektive Knöllchenbildung (s. S. 47) verursacht. St. Cx ist offensichtlich unter diesen Bedingungen ineffektiv, veranlaßt jedoch die Pflanze zur Bildung atypischer "Knöllchen" (Abb. 21, 22 und 24). Es könnte daraus geschlossen werden, daß St. Cx, als Transformant des *Rhizobium*-Stammes C, neue Eigenschaften erlangt, aber die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstoffassimilation verloren hat und möglicherweise die Virulenz des Bakteriums in bezug auf effektive Nodulation durch die Fähigkeit zur Induktion von Tumoren ersetzt wurde. Dieser an sich

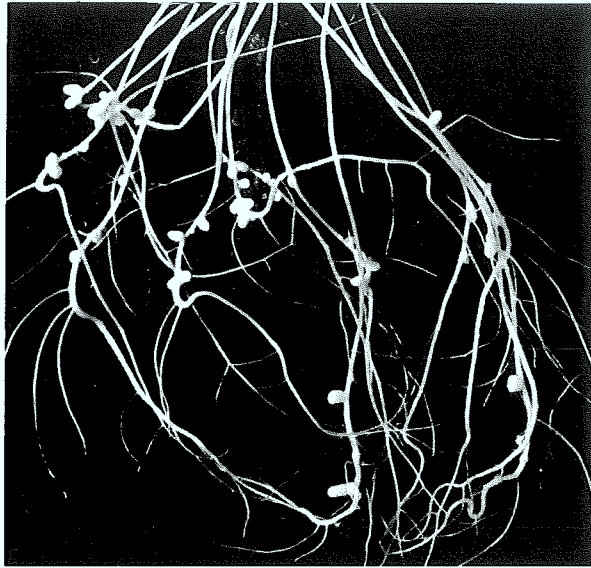


Abb. 20 Wurzel einer Erbsenpflanze mit normalen Knöllchen; effektive Nodulation.

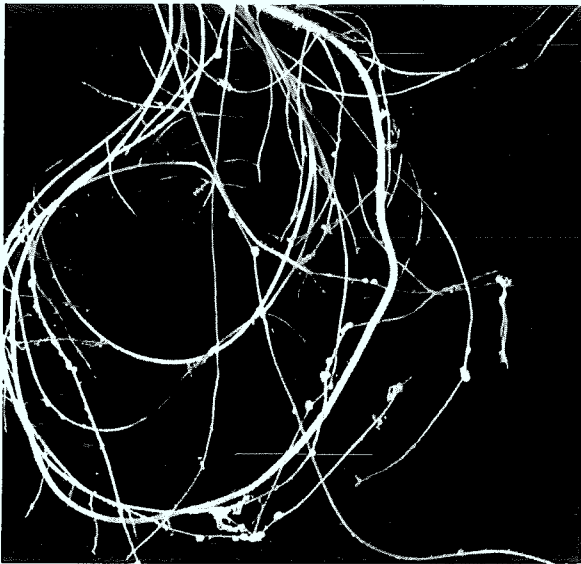


Abb. 21



Abb. 22

Abb. 21-22 "Pseudoknöllchen" an Wurzeln von *Pisum sativum*, in Gegenwart von *A. tumefaciens* (Abb. 21) bzw. von *St. Cx* entstanden. Man beachte die Schleimhäute an den Wurzeln (vergl. Abb. 24).

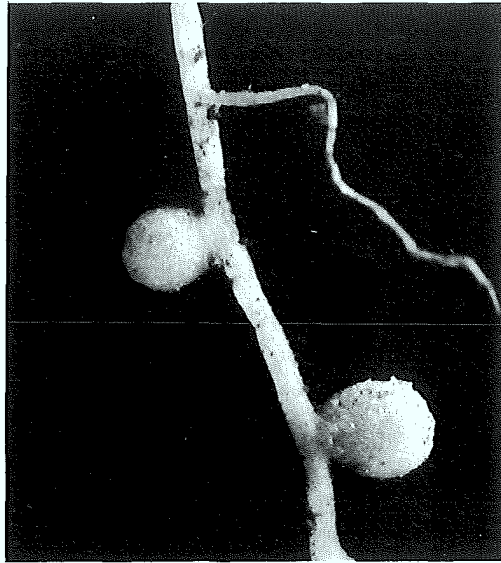


Abb. 23 Typische Wurzelknöllchen bei *Pisum sativum* nach Beimpfung mit *Rhizobium leg.* Stamm C.

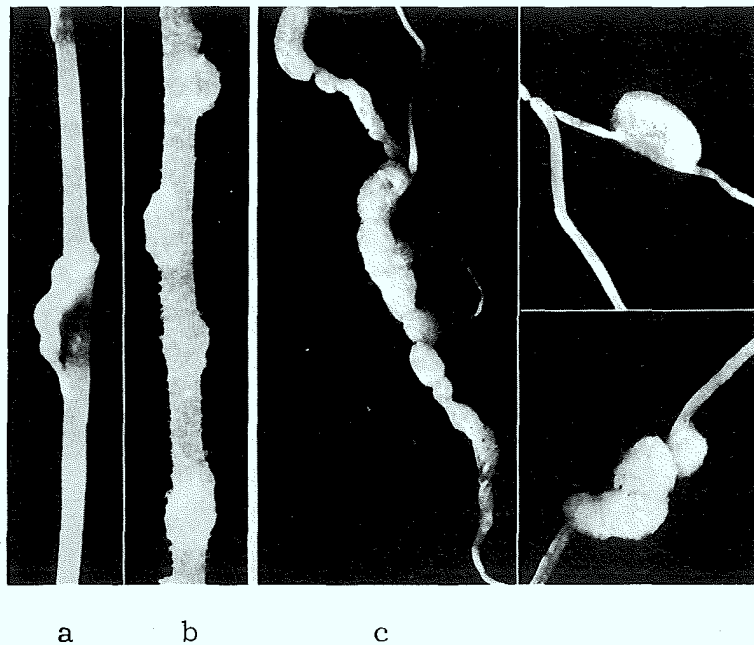


Abb. 24 Atypische Wurzelknöllchen bei *Pisum sativum* nach Beimpfung mit *A. tumefaciens*-Stamm 147 bzw. St. Cx.
a: Wurzel mit Schleimhülle (St. Cx); b: Wurzelproliferationen nach Entfernung der Schleimhaut (St. 147); c + d: Hypertrophien in Gegenwart von St. Cx und e: von St. 147 entstanden.

schon spekulativen Schlußfolgerung wird aber jegliche Realität entzogen durch die überraschende Feststellung, daß sich auch *A. tumefaciens* (St. 147) ähnlich verhält wie *St. Cx*.

Für die Entstehung dieser atypischen "Knöllchen" (Abb. 24) lag zunächst die Annahme nahe, daß von den in den Schleimhäuten sitzenden Bakterien produzierte Wachstoffsstoffe der Wurzel in hoher lokaler Konzentration zugeführt werden und so die Ausbildung von Hypertrophien bedingen, ohne daß dabei Bakterien in die Wurzel eindringen. Es könnte sich hier um "false nodules" handeln, wie sie von ALLEN und ALLEN (1940) erwähnt werden. Die Entstehung derartiger Schwellungen und knöllchenartiger Gebilde an den Wurzeln verschiedener Pflanzen kann verschiedene Ursachen haben. So ist z.B. bekannt, daß Kinetin oder Benzoessäurederivate (ARORA et al. 1959; ALLEN und NEWMAN 1953) ebenfalls Pseudoknöllchen hervorrufen können. Diese Erscheinung ist nicht auf Leguminosen beschränkt, sie ließ sich auch an Wurzeln von Tabakpflanzen (ARORA et al. 1959) beobachten. Für unsere Betrachtungen wäre die Entscheidung der Frage wichtig, ob diese im Falle *St. Cx* und *St. 147* beobachteten "Pseudoknöllchen" nur durch Einflüsse des Substrates (s. oben) oder durch Bakterien verursacht werden, die in das Wurzelgewebe eingedrungen sind. So konnte z.B. KRASSILNIKOW (1945 und 1955 s. bei WAGENBRETH 1965) aus ähnlichen Pseudoknöllchen virulente Rhizobien reisolieren. Auch WAGENBRETH (1965) berichtet über ähnliche Befunde. In unseren Versuchen gelang zwar in einigen Fällen die Isolierung von Bakterien aus solchen Gebilden (Abb. 24). Dies konnte aber nicht unbedingt als Beweis für das Vorkommen von Bakterien in den "Pseudoknöllchen" angesehen werden. Denn mit Rücksicht auf den geringen Durchmesser dieser Gewebe konnte die Oberflächensterilisation nur sehr kurz erfolgen, um ein Eindringen des Sterilisierungsmittels (Chlorkalklösung oder Sublimat s. S. 34) in das "Knöllchen"-Innere zu vermeiden. Die Gewähr für eine keimfreie Oberfläche war demnach nur bedingt gegeben.

Um dennoch die aufgeworfene Frage zu klären, erschien uns der direkte cytologische Nachweis von Bakterien im Gewebe aussichtsreicher

zu sein. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an ultradünnen Schnitten durch die "Pseudoknöllchen" sollte entschieden werden, ob sich St. Cx ähnlich verhält wie sein Ausgangsstamm (St. C) und St. 147 sich hierin unterscheidet. Trotz ähnlicher Gestalt erwarteten wir Unterschiede zwischen St. Cx und St. 147. Denn von *Agrobacterium tumefaciens* ist bekannt, daß es nur in den Interzellularen des befallenen Gewebes vorkommt (STAPP 1963; HOHL 1961 u. a.). Ein ähnliches Verhalten war daher auch in den "Knöllchen" anzunehmen, St. Cx dagegen könnte durchaus noch *Rhizobium*-Charakter haben. Im letzteren Falle müßten in gleicher Weise wie bei St. C charakteristische Stadien des Bakterienbefalls wie z. B. das Vorhandensein von Infektionsfäden und intrazellulärer Bakterien (SCHAEDE 1962) anzutreffen sein.

Etwa 0,3 bis 0,5 mm dicke Teilstücke von Pseudoknöllchen, die denen in Abb. 23b, d und e entsprechen, bzw. von normalen Wurzelknöllchen (St. C) wurden in 4%iger Lösung von Kaliumpermanganat bei 4°C oder in 2%iger Lösung von Osmiumtetroxyd und Kaliumbichromat (pH 7, 0,3 M) bei Zimmertemperatur fixiert. Eine zusätzliche Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure, die Einbettung in Vestopal. Die Schnitte wurden mit dem Ultramikrotom (LKB) angefertigt (Einzelheiten zur Methode s. v. WANGENHEIM 1965).

Wie aus den Abb. 25-27 zu ersehen ist, sind in allen drei Gewebetypen, d. h. echten Knöllchen (St. C) und in den "Pseudoknöllchen" (St. Cx und St. 147) sog. Infektionsfäden nachzuweisen. Bekanntlich verläuft die normale Infektion mit *Rhizobien* in der Weise, daß die Bakterien über die Wurzelhaare der Wirtspflanze in die Wurzelrinde eindringen und bis in die Nähe der Endodermis gelangen können. Sie sind dabei in eine gallertartige Masse, die Zoogloea, eingebettet, die ihrerseits von einem aus Zellulose und Pektin bestehenden Mantel - ein Produkt der Wirtspflanze - umgeben wird (Abb. 26). Ein solcher Infektionsschlauch zieht von Zelle zu Zelle, indem er durch die Zellwand hindurchwächst oder aber streckenweise die Mittellamelle auflöst, die Zellmembranen auseinanderdrückt und in dem so geschaffenen Zwischenraum entlangwandert. Beide Möglichkeiten scheinen in den vorliegenden Fällen verwirklicht zu sein, wie ein Vergleich z. B. zwischen Abb. 25, 26 und 28 zeigt.

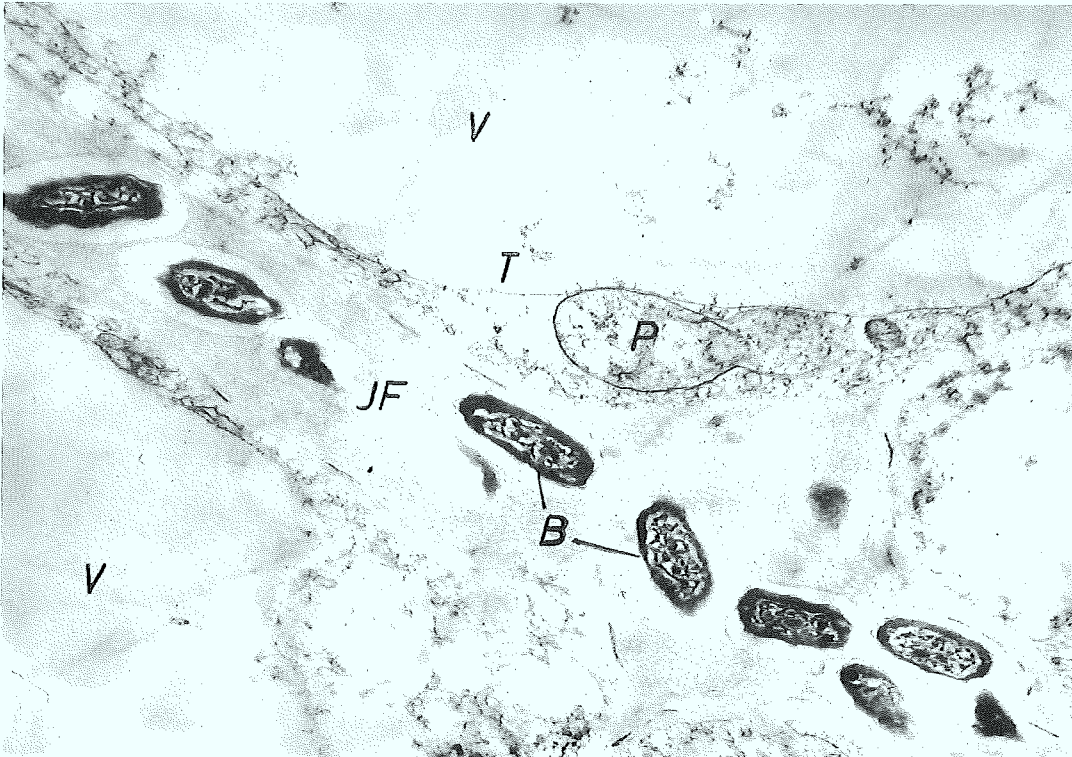


Abb. 25 Infektionsfaden in Wurzelknöllchen von *Pisum sativum*, beimpft mit *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C, Fixierung: Osmium-Chrom, Vergrößerung 17 500 x

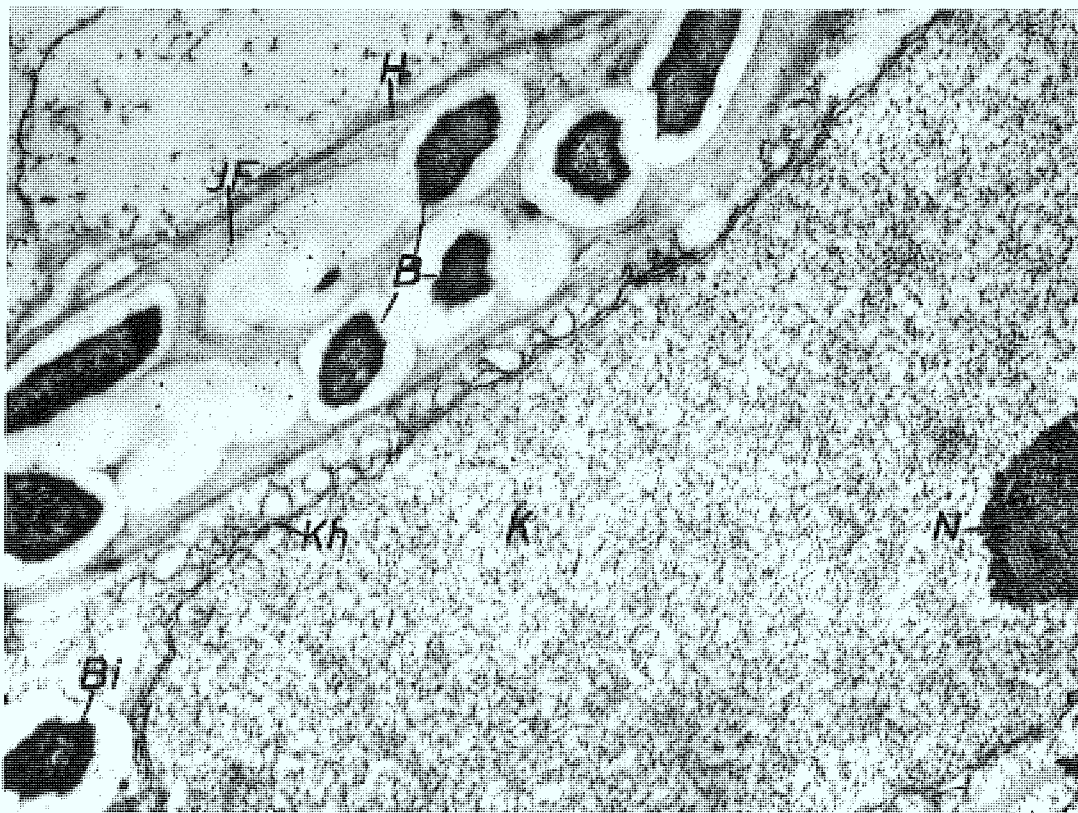


Abb. 26 Infektionsfaden in "Pseudoknöllchen" an Erbsenwurzeln (vergl. Abb. 21 und 24), die in Gegenwart von *A. tumefaciens*-Stamm 147 kultiviert wurden. Fixierung: Osmium-Chrom, Vergrößerung 24 500 x

Zeichenerklärung: B = Bacterium; Bi = intrazelluläres Bacterium; IF = Infektionsfaden; H = Hülle (Mantel) des Infektionsfadens; K = Zellkern; Kh = Kernhülle; N = Nucleolus; M = Mitochondrium; P = Plastid; T = Tonoplast; V = Vakuole; Zw = Zellwand



Abb. 27 Von einer Interzellulare her in die Zelle eindringender Infektionsfaden. Dünnschnitt durch ein atypisches Knöllchen, das in Gegenwart von St. Cx entstand (vergl. Abb. 22 und 24). Fixierung: Osmium-Chrom; Vergrößerung 25 000 x

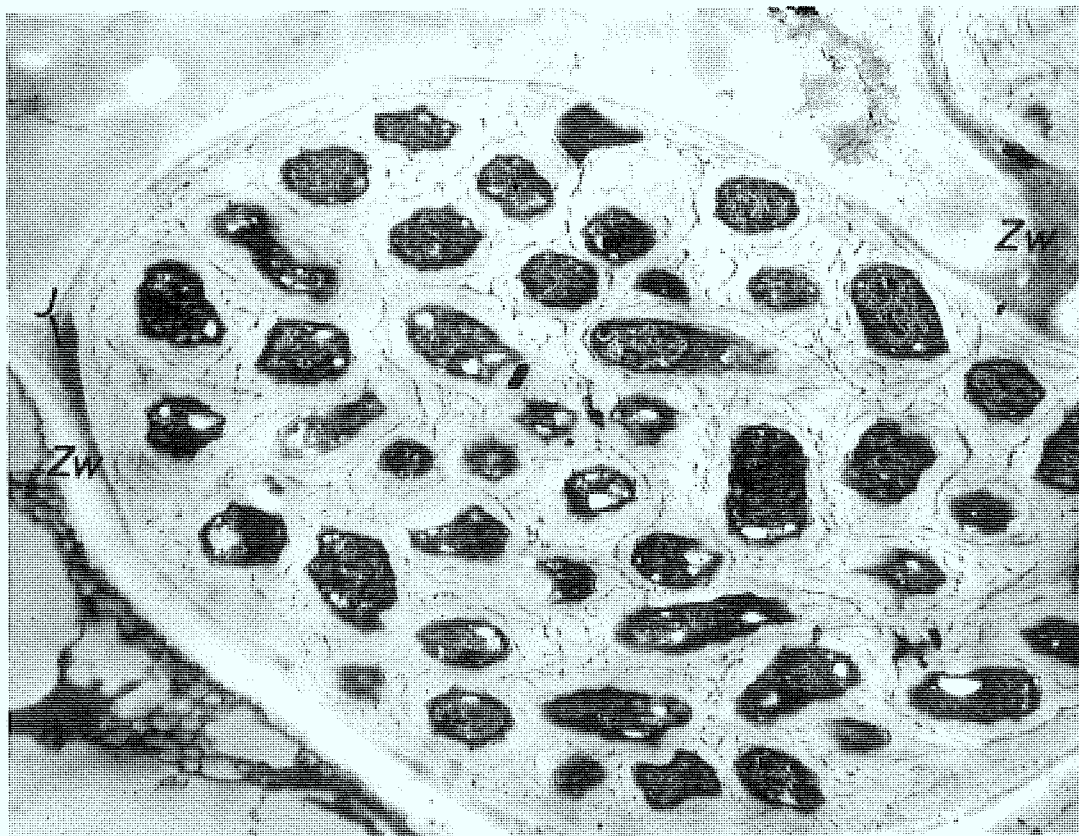


Abb. 28 Ein Infektionsfaden, der zwischen zwei Zellen liegt und diese auseinanderdrängt. "Pseudoknöllchen", bei Kultur mit St. 147 entstanden. Fixierung: KMnO_4 ; Vergrößerung 24 300 x;
Zeichenerklärung: Bi = intrazelluläre Bacterien; I = Interzellulare; IF = Infektionsfaden; Zw = Zellwand.

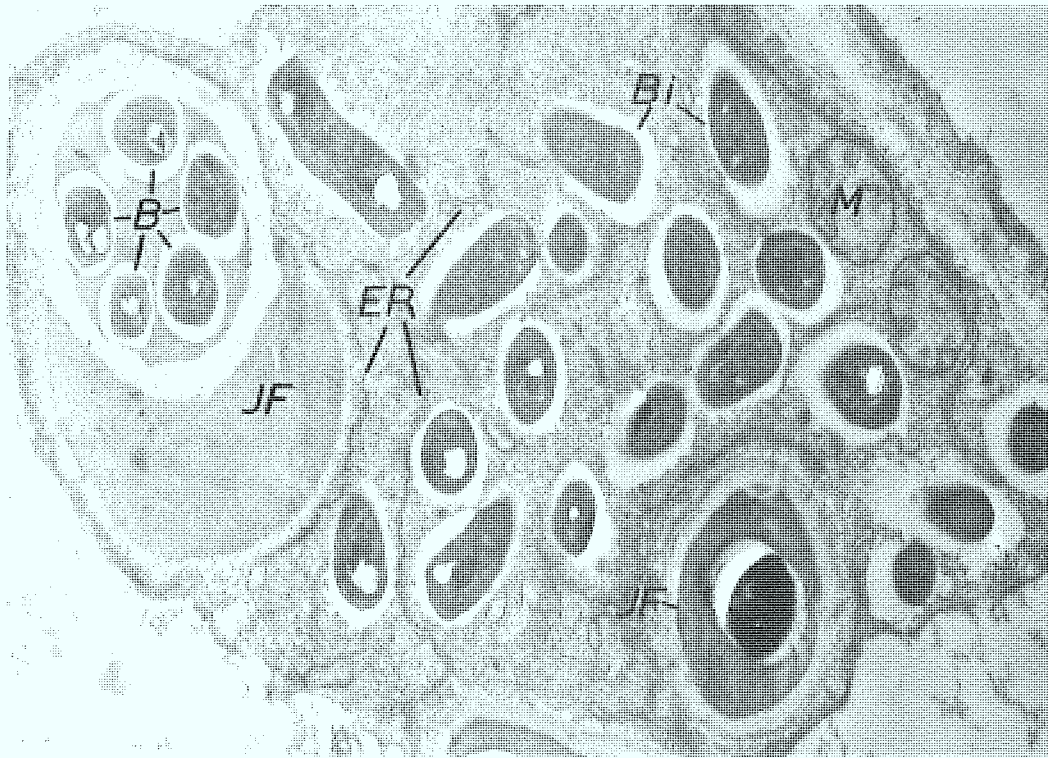


Abb. 29



Abb. 30 Legenden und Zeichenerklärung umseitig

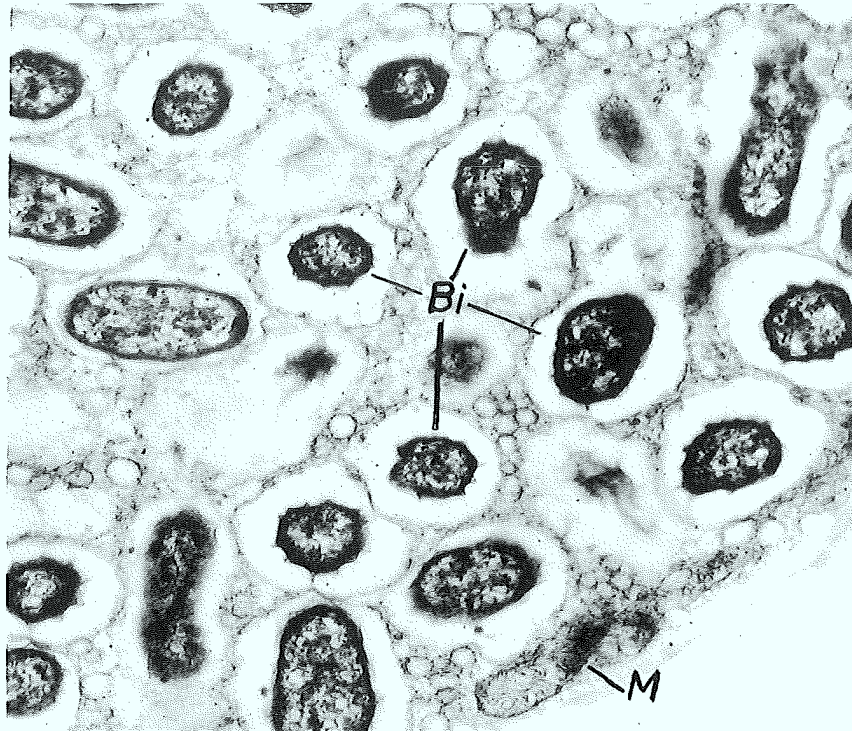


Abb. 31 Zelle mit zahlreichen intrazellulären Bacterien, wabige Struktur des Cytoplasmas (degenerativ), "Wurzelknöllchen" in Gegenwart von St. 147 entstanden. Fixierung: Osmium-Chrom, Vergrößerung 23 400 x

Abb. 29 (umseitig) Zelle mit zwei quergeschnittenen Infektionsfäden. Man beachte das Membransystem (endoplasmatisches Retikulum) in der Nähe der Fäden. Atypisches Wurzelknöllchen (A. tumefaciens-Stamm 147). Fixierung: KMnO_4 , Vergrößerung 21 600 x

Abb. 30 (umseitig) Querschnitt durch einen Infektionsfaden, der umgeben ist von der Kernmembran und endoplasmatischen Strukturen. Austritt eines Bacteriums in das Cytoplasma der Wirtszelle (Pfeil). Echtes Wurzelknöllchen (St. C), Fixierung: KMnO_4 , Vergrößerung 18 400 x

Zeichenerklärung: B = Bacterien im Infektionsfaden; Bi = intrazelluläre Bacterien; ER = endoplasmatisches Retikulum; G = Golgisystem; IF = Infektionsfaden; K = Zellkern; M = Mitochondrium

Die hier gezeigten elektronenmikroskopischen Bilder erlauben natürlich keine Aussagen über den dynamischen Verlauf der Infektion durch den jeweiligen Bakterienstamm. Es ist aber festzustellen, daß in allen drei Fällen in den normalen Wurzelknöllchen wie in den atypischen Infektionsschläuche anzutreffen sind. Bei St. C (Abb. 25) ist ein zwischen zwei Zellen entlangleitender Schlauch zu erkennen. In eindrucksvoller Weise ist in Abb. 26 ein Infektionsschlauch (St. 147) zu sehen, der unmittelbar an einem Zellkern entlangwächst, eine Erscheinung, die bei echten Wurzelknöllchen häufig zu beobachten ist (SCHAEDE 1962). Den Beginn eines Infektionsfadens, der von engen, röhrenförmigen Ausstülpungen der Zellwand der Wirtszelle seinen Anfang nimmt und in das Cytoplasma der Zelle vorstößt, sieht man in Abb. 27 (St. Cx). Abb. 28 demonstriert einen "Faden", der zwei benachbarte Wirtszellen auseinanderdrängt (St. 147).

Die Infektion des Wirtsgewebes schreitet weiter vor, indem die Bakterien in die Zellen einwandern bzw. in diese entlassen werden. Die Bakterien vermehren sich in starkem Maße und füllen schließlich die Wirtszelle fast ganz aus (Abb. 31). In Abb. 30 ist ein solcher Übertritt zu sehen, hierbei gelangen die Bakterien an die Peripherie des Infektionsfadens und durchbrechen dabei das ihn umgebende Netz des endoplasmatischen Retikulums (s. auch Abb. 29).

Die hier wiedergegebenen elektronenmikroskopischen Bilder stimmen im wesentlichen mit den Beobachtungen überein, die GRILLI (1963) an normalen Wurzelknöllchen von *Pisum sativum* und DART und MERCER (1964) an solchen von *Trifolium subterraneum* und von *Medicago tribuloides* gemacht haben. Die einzelnen Stadien der Bakterieninfektion finden sich überraschenderweise sowohl in echten Knöllchen (St. C) wie in den "Pseudoknöllchen" (St. 147 und St. Cx). Entgegen unseren Erwartungen (s. S. 53) lassen sie sich auch in den "Knöllchen" nachweisen, die in Gegenwart von *Agrobacterium tumefaciens* an den Erbsenwurzeln entstanden. Wie eindeutig gezeigt werden konnte, treten in diesem Falle die Bakterien auch intrazellulär auf. Die Deutung dieser elektronenmikroskopischen Befunde ist schwierig. Wichtig hierbei

ist zunächst die Feststellung, daß unbeimpfte Kontrollpflanzen in keinem Falle irgendwelche Bildungen wie die beschriebenen "Pseudoknöllchen" aufwiesen. Wenngleich peinlichst auf die Oberflächensterilität der Erbsen geachtet wurde, ist damit nicht ausgeschlossen, daß die Samen innen unsteril waren. Nach den Untersuchungen von STOLP (1952) kann es vorkommen, daß zwischen Samenschale und Kotyledonen der Erbsen Bakterien vorhanden sind, die bei der Keimung nach außen gelangen und die vorher äußerlich sterilisierten Samen erneut infizieren. Auf unseren Fall übertragen, bedeutete dies, daß das benutzte Saatgut im Innern mit Knöllchenbakterien kontaminiert wäre. Bei diesen Bakterien müßte es sich um unspezifische handeln, die an Erbsen nur eine ineffektive und noch dazu eine atypische Knöllchenbildung verursachen. Die Frage nun, warum die unbeimpften Kontrollpflanzen nie derartige "Knöllchen" bildeten, fände ihre Beantwortung in der Annahme, daß St. Cx bzw. St. 147 Stoffe in das Kulturmedium (s. methodische Durchführung des Knöllchentestes S. 48) abgeben und dadurch die fremden Rhizobien erst zur Infektion befähigen. Dabei möge die Frage offenbleiben, ob sich die Bakterien vermehren oder aber die Stoffe (Wachsstoffe, Vitamine etc.) des inokulierten Bakterienstammes (St. Cx bzw. St. 147) bei der Infektion der fremden Rhizobien behilflich sind. Diese Annahme erscheint berechtigt zu sein, da erwiesen ist, daß für eine Nodulation ein gewisses zahlenmäßiges Minimum an Knöllchenbakterien notwendig ist und Wachsstoffe eine wichtige Rolle hierbei spielen (THIMANN 1964). Ein Hinweis darauf, daß für das Zustandekommen der Pseudoknöllchen das von uns verwendete Saatgut (Erbsen) und weniger die geprüften Bakterienstämme verantwortlich zu machen sind, ist das Ausbleiben solcher "Knöllchen" bei Benutzung anderer Saatgutschargen derselben Erbsensorte (s. oben).

Die hier begründete Deutung der anomalen Knöllchenbildungen war erst möglich durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Hätten wir uns bei den Knöllchentesten (s. S. 48) auf einen Vergleich zwischen St. C und St. Cx beschränkt, so wäre die Schlußfolgerung eine andere gewesen. Der Grund dafür, daß wir auch *Agrobacterium*

tumefaciens mit in diesen Vergleich einbezogen, waren u.a. Beobachtungen von BONNIER (1961). Er stellte fest, daß speziell Leguminosenpflanzen an ihren Wurzeln unter keimfreien Bedingungen spontan Auswüchse bilden. Werden nach dem Auftreten dieser tumorartigen Gebilde die Pflanzenkulturen mit *Rhizobium*- oder *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen beimpft, so dringen diese Bakterien in diese Wurzeltumoren ein und vermehren sich dort. BONNIER deutet diese Erscheinung als das erste Symptom eines Adaptierungsprozesses nichtspezifischer Rhizobien bzw. Agrobakterien an eine gegebene Leguminosenpflanze. Da sich in unseren Versuchen jedoch niemals derartige Wurzeltumoren an den unbeimpften Kontrollpflanzen feststellen ließen, dürfte ein solcher Vorgang im vorliegenden Fall auszuschließen sein.

Dagegen konnte eine andere Beobachtung desselben Autors bestätigt werden (BONNIER 1960), wonach *A. tumefaciens* auch ohne vorangehende

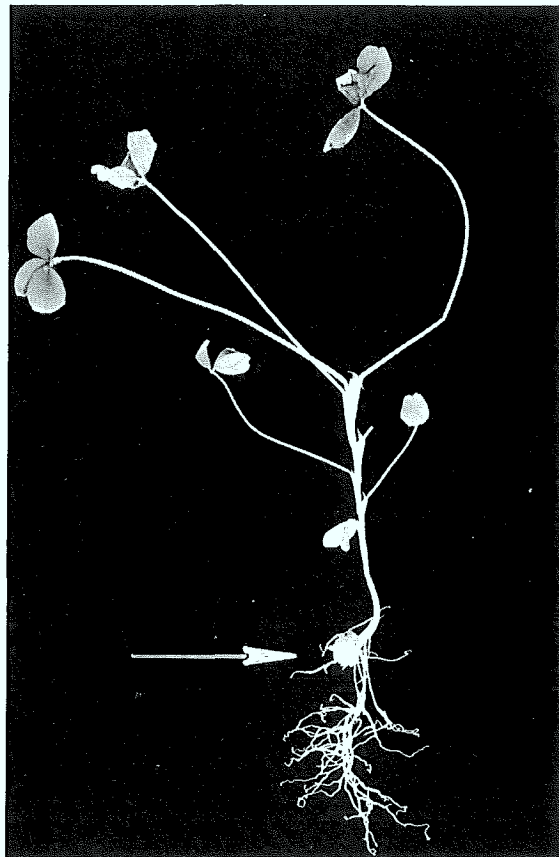


Abb. 32 Kleeflanze mit einem Tumor am Wurzelhals (Pfeil), hervorgerufen durch *A. tumefaciens*-Stamm Dahlia-Ra ohne künstliche Verwundung der Pflanze.

künstliche Verwundung der Wirtspflanze die Bildung von Tumoren induzieren kann (vergl. S. 4 ff.). Bei Sterilkulturen von Kleepflanzen auf Sand in geschlossenen Erlenmeyerkolben fanden wir nach Beimpfung mit verschiedenen *A. tumefaciens*-Stämmen an einigen wenigen Pflanzen tumorartige Gebilde (Abb. 31). Nach Ansicht von BONNIER sind Wundstellen, die unter natürlichen Bedingungen z.B. bei der Anlage von Sekundärwurzeln bei Verzweigungen etc. entstehen, hierfür verantwortlich zu machen.

Für unsere Betrachtungen ist festzuhalten, daß St. Cx als Transformant des Rhizobium-Stammes C offensichtlich nicht die Fähigkeit zur Knöllchenbildung an Erbsenwurzeln besitzt. Die Entstehung der "Pseudoknöllchen" hat ihre Ursache vermutlich in der Beschaffenheit des für die Anzucht der Versuchspflanzen verwendeten Saatgutes.

B Vergleichende morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen an den Partnern der Transformation

Der transformierte St. Cx hat die Fähigkeit zur Induktion pflanzlicher Tumoren erlangt, andererseits aber ist er nicht mehr in der Lage, typische Wurzelknöllchen an Erbsenpflanzen hervorzurufen. Die zunächst als ineffektive Knöllchen angesehenen "Pseudoknöllchen" (vergl. S. 48 ff.) werden vermutlich nicht durch dieses Bakterium verursacht. Wir sind zu dieser Auffassung aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen gekommen (S. 53 ff.). Es ist aber nicht anzunehmen, daß bei der genetischen Transformation zwischen *A. tumefaciens* und *Rhizobium* nur die Virulenz des DNA-Donators übertragen wird und gleichzeitig nur die für *Rhizobium* spezifische Fähigkeit zur Nodulation erlischt. Vielmehr ist zu erwarten, daß als Folge genetischer Veränderungen auch andere Merkmale betroffen sind.

So müßte die genetische Verschiedenheit der drei Partner - Donator St. 147, Acceptor St. C und Transformant St. Cx - durch vergleichende morphologische und physiologisch-chemische Untersuchungen zum Ausdruck kommen.

1. Morphologische Charakterisierung

Da zwischen den Gattungen *Agrobacterium* und *Rhizobium* eine große morphologische Ähnlichkeit besteht (vergl. BERGEY 1957), sind die Aussichten, eine klare Differenzierung zwischen *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147, *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C und dem Transformanten Stamm Cx auf morphologischer Basis zu erhalten, von vornherein sehr gering. Sieht man von der für Rhizobien charakteristischen Umwandlung in bacterioide Formen ab, die sich z.B. in Gegenwart von Alkaloiden oder bei dem Befall von Leguminosenwurzeln in der Wirtszelle (s. S. 53) vollzieht, und beschränkt sich auf den Ver-

gleich der unter gleichen Bedingungen kultivierten Bakterien, so handelt es sich in jedem Falle um bewegliche, stäbchenartige, gramnegative Formen. Wie zu erwarten, ließen Längen- und Breitenmessungen der Bakterienzellen der entsprechenden Stämme keine großen Unterschiede erkennen (Tabelle 2).

Für diese Messungen wurden hitzefixierte Ausstriche aus Bakterienkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase mit Karbolfuchsin gefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion 100/1,25) photographiert. Die Ausmessungen erfolgten an Sekundärvergrößerungen (3200-fach) bei Verwendung des Zeiss-Teilchengrößenanalysators TGZ 3. Je Bakterienstamm wurden 400 Längen- und 100 Breitenmessungen vorgenommen und diese exponentiell als Summenkurve aufgetragen. Die Berechnung der Mittelwerte und ihrer Streuung erfolgte im Wahrscheinlichkeitsnetz (WEBER 1957).

Tabelle 2 Bakteriengröße und Begeißelung

	St. 147	St. Cx	St. C
Länge	2,09 μ \pm 0,485	2,13 μ \pm 0,471	2,19 μ \pm 0,481
Breite	0,69 μ \pm 0,058	0,72 μ \pm 0,065	0,79 μ \pm 0,070
Begeißelung	peritrich 4-6 Geißeln	subpolar monotrich	subpolar monotrich

Die bei *A. tumefaciens* erstmalig von STAPP und BORTELS (1931) eingehend untersuchten Sternbildungen, rosettenartige Aggregationen von Bakterien, sind nach Auffassung verschiedener Autoren (STAPP 1958; STAPP und KNÖSEL 1954; KNÖSEL 1963 u. a.) mit Sexualvorgängen verbunden. Das Vorkommen solcher Stadien ist jedoch nicht spezifisch für *A. tumefaciens*. Sie lassen sich innerhalb der taxono-

mischen Gruppe der Rhizobiaceae, aber auch außerhalb derselben z.B. bei der Gattung *Pseudomonas* (HEUMANN 1962) nachweisen. Im vorliegenden Falle waren bei allen drei Stämmen solche Sternbildungen zu beobachten, wenngleich diese Eigenart besonders bei St. 147 ausgeprägt zu sein scheint. Die charakteristische Anordnung unserer Bakterien bot dann einen ähnlichen Aspekt wie KNÖSEL (1963) ihn z.B. bei *Agrobacterium rhizogenes* beobachtete. Abb. 33 ist eine Reproduktion von Photos, die von diesem Autor veröffentlicht wurden.

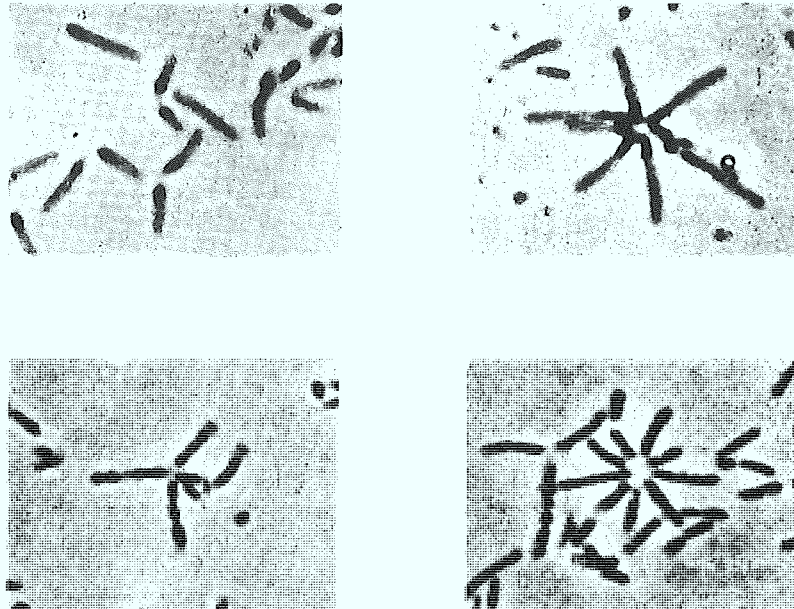


Abb. 33 Verschiedene Phasen der Sternbildung bei *Agrobacterium rhizogenes*, entnommen aus einer Veröffentlichung von KNÖSEL (1963). Feulgenfärbung, Phasenkontrast, Vergrößerung 1 : 3000

Im Gegensatz zu den bisher dargelegten Befunden bietet jedoch die Begeißelung ein Unterscheidungsmerkmal (Abb. 34-36). Für die elektronenmikroskopische Darstellung des jeweiligen Begeißelungstyps benutzen wir verschiedene Präparationsmethoden. Besonders bei St. 147

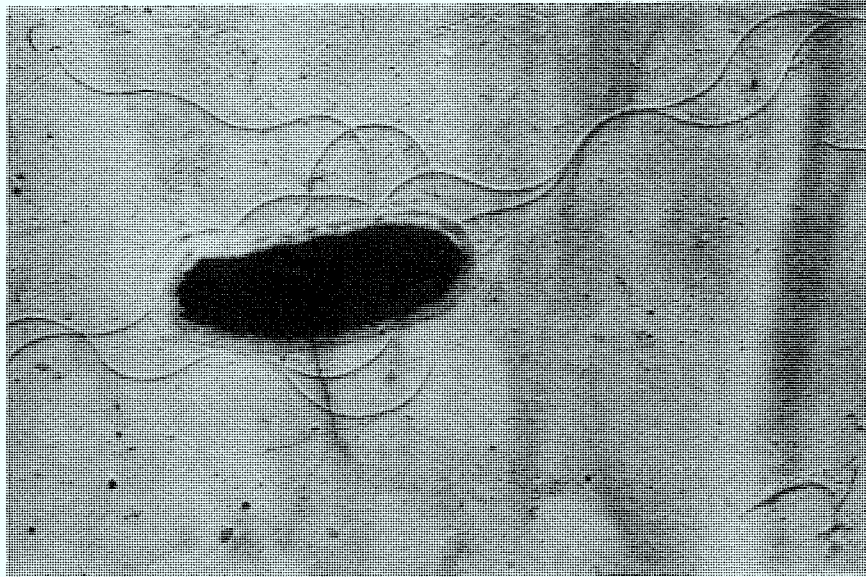


Abb. 34



Abb. 35

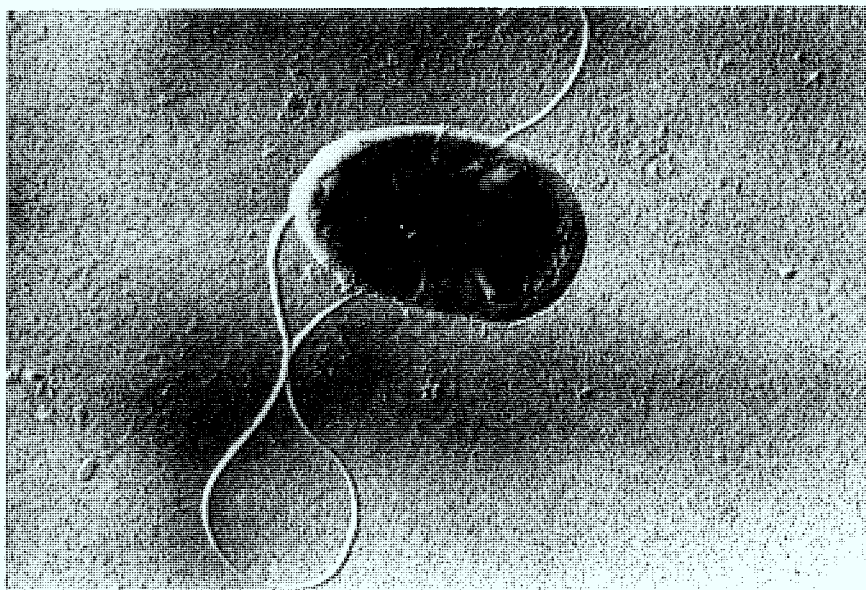


Abb. 36

Abb. 34-36 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147; Vergr. 16 000 x (Abb. 34), dem transformierten Stamm Cx; Vergr. 27 000 x (Abb. 35) und von *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C; Vergr. 26 300 x (Abb. 36).

erwiesen sich die "Negativfärbung" mit Phosphorwolframsäure (BRENNER und HORNE 1959), wie das Auftrocknen oder Aufsprühen von Bakterien-suspensionen auf die Trägerfolie mit nachfolgender Schrägbedampfung als wenig geeignet. Die Geißeln wurden dabei entweder vom Bakterienkörper abgerissen oder aber die Bakterien verklumpten. Wir führten schließlich die Präparation in Anlehnung an die Methoden von HILLIER et al. (1948) und HOUWINK und van ITERSON (1950) auf folgende Weise durch:

Auf die Oberfläche von Mannitagar in einer Petrischale wird eine 2%ige Lösung von Kollodium in Amylacetat ausgegossen, die Petrischale geneigt und mit steriler Pipette die überschüssige Lösung entnommen. Nach Auftropfen der Bakteriensuspension auf den verfestigten Kollodiumfilm und anschließender Bebrütung (18 h bei 28°C) öffnet man die Schale und läßt die Oberfläche des Agars etwas trocknen. Dann zerschneidet man den Kollodiumfilm mit einem Rasiermesser in etwa 1 cm² große Felder, gibt vorsichtig Wasser hinzu und flotiert so den Film auf der Wasseroberfläche. Kupfernetze (mit Formvar und durch Kohlebedampfung stabilisiert) werden von unten her an den Film herangeführt und mit ihm aus dem Wasser gehoben. Nach Trocknung an der Luft erfolgt die Schrägbedampfung mit Platin/Iridium oder mit Palladium bei einem Winkel von ca. 40°.

Wie aus den Abb. 34-36 zu ersehen ist, repräsentieren St. C und St. Cx den subpolar monotrichen und St. 147 den peritrichen, 4-6 Geißeln führenden Flagellationstyp mit normaler Wellenlänge der Geißeln in allen drei Fällen. Wir legten hierbei die Terminologie von LEIFSON (1960) zugrunde (vergl. auch Tabelle 2). Die Tatsache, daß nur St. 147 eine peritriche Begeißelung gegenüber dem subpolaren, monotrichen Flagellationstyp bei St. Cx und St. C aufweist, die Kulturbedingungen aber die gleichen waren, demonstriert die enge morphologische Beziehung zwischen dem genetischen Acceptor (St. C) und seinem Transformanten (St. Cx).

2. Physiologische Eigenschaften

Für die weitere Differenzierung unserer drei Bakterienstämme benutzten wir in der Bakteriologie übliche Nachweismethoden für bestimmte

physiologische Eigenschaften. Sie werden hier , nur soweit notwendig, näher erläutert:

1. Bestimmung des thermalen Tötungspunktes: Rörchen mit je 1 ml Mannitnährlösung suspendierter Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase werden 10 min je Temperaturstufe ($50-60^{\circ}\text{C}$ in Intervallen von 1°C) erhitzt, dann abgekühlt, mit 1 ml frischer Nährlösung ("Pisum-Medium": 2 g Hefeextrakt; 10 g Mannit; 500 mg KH_2PO_4 ; 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 500 mg CaCO_3 , pH 6,8 dest. Wasser ad 1000 ml) versetzt und 24 h bei 28°C bebrütet. Unter dem thermalen Tötungspunkt wird derjenige Temperaturgrad verstanden, bei dem die Bakterien gerade abgetötet werden (s. STAPP 1958, S. 56).

2. "Bunte Reihe": Zu der mit Lackmus versetzten Stammlösung (10 g Pepton; 5 g NaCl; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 1 g KH_2PO_4 in 1000 ml Lösung) werden die Substanzen der "bunten Reihe" (MERCK 1962) zugegeben (1%ig), mit je 5 ml der betreffenden Lösung beschickte Rörchen beimpft, 4 Tage bei 28°C bebrütet und der dann gemessene pH-Wert mit dem der unbeimpften Kontrolle verglichen.

Weiterhin prüften wir 3. Lackmusmilch (JANKE 1946, S. 116), 4. Stärkeabbau (JANKE 1946, S. 217), 5. Gelatineabbau nach FRAZIER (JANKE 1946, S. 218), 6. Indolbildung nach EHRLICH-BÖHME und nach KOVACS (JANKE 1946, S. 219), 7. Reduktion von Nitrat zu Nitrit bzw. NH_3 (JANKE 1946, S. 219) und 8. Schwefelwasserstoffbildung (JANKE 1946, S. 220). Ferner benutzten wir folgende Differential-Nährböden: 9. Glucose-Ammonium; Glucose-Nitrat und Glucose-Glutamat in der Zusammensetzung: 10 g Glucose; 1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 200 mg KCl; 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ bzw. 10 g Glucose; 1 g NaNO_3 ; 1 g K_2HPO_4 ; 500 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 200 mg KCl bzw. 10 g Glucose; 5 g Na-Glutamat; 1 g K_2HPO_4 ; 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 100 mg KCl, dest. Wasser ad 1000 ml und pH 7,2 in allen drei Lösungen (KOMAGATA 1961); 10. Selenit-Agar (BURROWS 1959, S. 19); 11. Ca-Glycerophosphat: 0,8 g Ca-Glycerophosphat; 20 g Mannit; 5 g KNO_3 ; 3,8 g NaCl; 100 mg KCl; 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 600 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7, dest. Wasser ad 1000 ml (STARR 1946); 12. Endo-Agar (BURROWS 1959, S. 18); 13. Kongorot-Agar: Mannit-Agar (s. S. 33) mit Zusatz von Kongorot 1 : 20 000 (STAPP 1958, S. 74).

Die in Tabelle 3 zusammengestellten Ergebnisse dieser Vergleiche lassen nur einige Eigenschaften erkennen, in denen sich die drei Bakterienstämme deutlich voneinander unterscheiden. So hat jeder Stamm einen spezifischen thermalen Tötungspunkt. Im Verhalten gegenüber Lackmusmilch ist in allen drei Fällen eine Alkalinisierung festzustellen, nur St. 147 reduziert außerdem den Farbstoff (farblos) innerhalb von vier Tagen. Neben einer schwachen Indolbildung und einem geringen Stärkeabbau ist ebenfalls nur bei St. 147 die Reduktion von Nitrat zu

Tabelle 3 Physiologie

	St. 117	St. Cr	St. C
1. Thermaler Tötungspunkt	53/54°C	51/52°C	54/55°C
2. „Bunte Reihe“ ¹ :			
Äsculin	- 0,2	+ 0,2	+ 0,1
Arabinose	- 0,3	+ 0,1	- 0,2
Dulcit	- 0,3	= 0	- 0,1
Galaktose	- 0,3	- 0,1	- 0,3
Glucose	- 0,5	- 0,3	- 0,2
Inulin	+ 0,3	+ 0,5	+ 0,6
Lactose	± 0	= 0	± 0
Fructose	+ 0,3	- 0,1	- 0,2
Maltose	- 0,1	+ 0,1	± 0
Mannose	- 0,3	- 0,2	- 0,3
Raffinose	+ 0,3	+ 0,5	+ 0,6
Rhamnose	- 0,5	- 0,3	- 0,2
Saccharose	± 0	+ 0,1	+ 0,4
Salicin	+ 0,4	+ 0,2	+ 0,5
Xylose	+ 0,1	+ 0,2	+ 0,1
3. Lackmusmilch ²	+ 0,9	+ 0,8	+ 0,8
	Farbstoff nach 4 Tagen abgebaut sehr schwach	unverändert	unverändert
4. Stärkeabbau		-	-
5. Gelatineabbau:			
Sublimatplatte	-	-	(+)
Gerbsäureplatte	-	-	sehr schwach
6. Indolbildung:			
nach EHRlich-BÖHME	-	-	-
nach KOVACS	(+)	-	-
7. Nitratreduktion:			
Nitrit	+	-	-
Ammoniak	-	-	-
8. H ₂ S-Bildung	(+)	(+)	-
9. Glucose-Ammonium	(+)	(+)	(+)
Glucose-Nitrat	(+)	(+)	(+)
Glucose-Glutamat	+	+	-
10. Selenit-Agar	Wachstum rötlich ³	Wachstum rötlich	schwaches Wachstum farblos
11. Ca-Glycerophosphat	+	+	(+)
12. Endo-Agar	rot	rot	farblos
13. Kongorotplatte	Farbstoffabsorption in allen drei Fällen		

+ = positiv; (+) = eindeutig positiv, aber schwach; -- = negativ.

¹ Die Zahlenwerte stellen die Abweichungen des pH-Wertes gegenüber der unbeimpften Kontrolle (pH 7) dar.

² Ebenfalls die Veränderungen des pH-Wertes gegenüber der unbeimpften Kontrolle, deren pH-Wert auf 6,2 eingestellt wurde.

³ Verfärbung des Nährbodens.

Nitrit nachweisbar. Indolbildung und Nitratreduktion aber werden häufig als Differenzierungsmerkmale von *A. tumefaciens* gegenüber *A. gypsophilae* oder *A. rhizogenes* in der Taxonomie benutzt (BERGEY 1957, S. 288). In der Fähigkeit, in Glucose-Glutamat und in Calciumglycerophosphat sowie auf Selenit- und auf Endo-Agar zu wachsen und ferner in der Produktion geringer Mengen an Schwefelwasserstoff ähneln sich St. 147 und St. Cx. Demnach hat St. Cx in einigen Fällen ähnliche Wachstumsansprüche wie St. 147. Er ist in der Lage, im Gegensatz zu St. C auf einfachen Nährböden wie Glucose-Glutamat und in Calciumglycerophosphat zu wachsen, ist also bezüglich der Nährstoffe anspruchslos wie *A. tumefaciens*, was u. a. seine Ursache in der Fähigkeit zur Synthese wichtiger Vitamine wie Biotin, Riboflavin, Thiamin und Panthothensäure hat (McINTIRE et al. 1941, s. bei STAPP 1958; STARR 1946). Nur bei St. C ist ein leichter Abbau von Gelatine nachzuweisen. Im vorliegenden Falle ist bei allen drei Stämmen kein Unterschied in der Absorption von Kongorot festzustellen. Im Gegensatz zu den Befunden von BRYAN (1938, s. bei STAPP 1958) war auch bei einem Vergleich mehrerer *Agrobacterium*- und *Rhizobium*-Stämme keine Differenzierung dieser beiden Genera in bezug auf Speicherung von Kongorot möglich (vergl. dagegen BERGEY 1957, S. 289).

3. Abbau von Lactose

BERNAERTS und DE LEY (1958, 1960 a, b, 1961, 1963) beschrieben einen neuen Typus des bakteriellen Abbaues von Disacchariden, der spezifisch für *Agrobacterium tumefaciens* ist und sonst nur noch bei *A. radiobacter* anzutreffen sein soll. Durch Oxydation der Glykosidkomponente am C-3-Atom entstehen die entsprechenden 3-Keto-glykoside (Synonym: Glykosid-3-ulosen). Die chemische Struktur dieser neuen Zucker wurde inzwischen von mehreren Forschungsgruppen aufgeklärt (s. FUKUI 1965, dort die einschlägige Literatur). Es war daher naheliegend, diese Eigenschaft der Gattung *Agrobacterium* als taxonomisches Merkmal zu benutzen. BERNAERTS und DE LEY (1963)

schlagen einen biochemischen Test vor, der auf der Bildung von 3-Ketoglykosiden (besonders von 3-Ketolactose) basiert und den Nachweis von *A. radiobacter* und *A. tumefaciens* ermöglicht. Da die Untersuchungen von MANIGAULT und BEAUD (1963)¹⁾ Hinweise dafür geben, daß bei *A. tumefaciens* eine Parallelität zwischen Bildung von 3-Ketolactose und Virulenz (Tumorinduktion) bestehen könnte, verdient dieser Test besondere Beachtung. Hierbei wird die beim Abbau von Lactose entstehende 3-Ketolactose, ein D-Xylohexos-3-ulose-D-glucopyranosid (FUKUI et al. 1963 a, b), im Plattentest durch die Reduktion von BENEDICT's Reagenz - sie erfolgt schon bei Zimmertemperatur - nachgewiesen (Abb. 36). Die Vorteile dieser Methode liegen darin, daß sie schnell arbeitet (2 Tage), taxonomische Aussagen ermöglicht und den biologischen Virulenznachweis durch experimentelle Tumorinduktion wenigstens z.T. ersetzen kann. Wir stellten uns außerdem die Frage, ob dieser biochemische Nachweis nicht auch geeignet sei für die quantitative Bestimmung virulenter und avirulenter Bakterien oder zumindest die Selektionierung virulenter Transformanten erleichtert.

Der Lactose-Test (L-Test) erfolgte nach den Angaben von BERNAERTS und DE LEY (1963). Allerdings verwendeten wir gepufferten Agar. Der Lactose-Agar setzt sich zusammen aus:

10 g Lactose; 1 g Hefeextrakt; 20 g Agar und Phosphatpuffer (30 ml einer Lösung bestehend aus 50 ml 0,1 M KH_2PO_4 und 29,1 ml 0,1 M NaOH), pH 7, dest. Wasser ad 1000 ml. Mit diesem Agar beschickte Petrischalen werden in der Mitte mit dem zu prüfenden Bakterienstamm mittels Impföse dicht beimpft, 1-2 Tage bei 28°C bebrütet und dann je Platte mit 2 ml Benedict's Reagenz übergossen. Nach spätestens 15 min bildet sich um die Bakterienkultur (*A. tumefaciens*) ein gelber Ring von Cu_2O . Dieser Test wird als spezifisch für die Bildung von 3-Ketolactose angesehen.

Wir führten diesen Nachweis an St. 147, St. Cx und an St. C durch. Hierbei reagierten St. 147 und St. Cx positiv und, wie zu erwarten, St. C negativ (Abb. 37). Es war daher anzunehmen, daß St. Cx mit der Übernahme der Virulenz auch den für *A. tumefaciens* typischen Abbaumechanismus von Kohlenhydraten erworben hat. Da aber die Reduktion von Cu^{++} im L-Test nicht unbedingt spezifisch für 3-Ketolactose sein muß, wurden weitere Nachweisreaktionen durchgeführt.

1) C.R. Acad. Sci. (Paris) 256, 2469-2470 (1963).

Zunächst benutzten wir die zum Nachweis von α -Ketosäuren gebräuchliche Semicarbazid-Reaktion (MacGEE und DOUDOROFF 1954):

Der klarzentrifugierte Überstand 2 Tage alter Bakterienkulturen in flüssigem Lactose-Medium (s. oben) wird nach entsprechender Verdünnung mit dem gleichen Volumen (2 ml) Semicarbazidlösung (1 % Semicarbazid + 1,5% Natriumacetat . 3 H₂O) versetzt, 15 min bei 30°C inkubiert und das Reaktionsgemisch mit dest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt. UV-Absorptionspektren solcher Ansätze werden im Spektralbereich von 220-250 m μ in Intervallen von 2 m μ aufgenommen (Abb. 38).

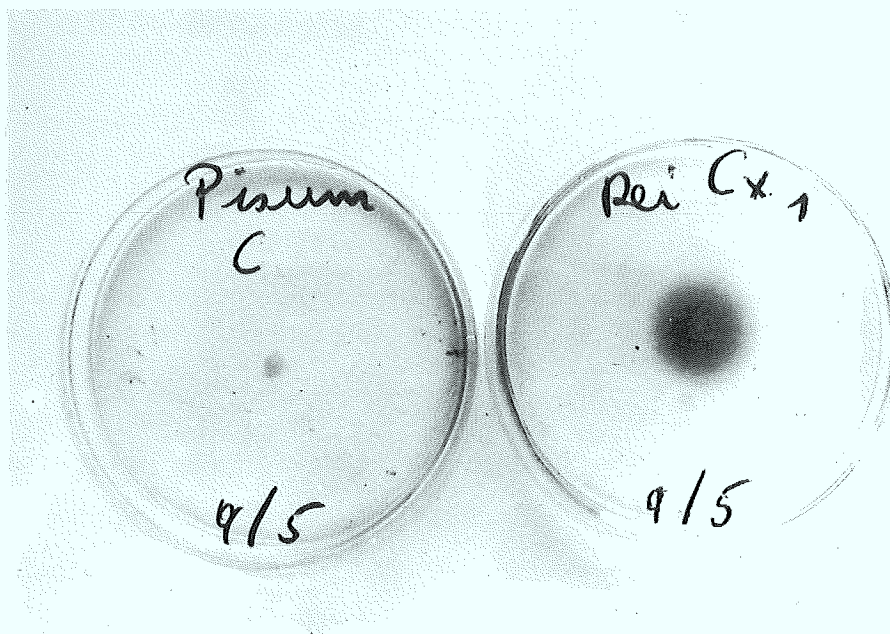


Abb. 37 Lactose-Test nach BERNAERTS und DE LEY (1963)
links St. C (negativ), rechts St. Cx (positive Reaktion)
Bildung des Reduktionshofes.

Die UV-Absorptionsspektren von entsprechenden Ansätzen mit St. 147 und St. Cx unterscheiden sich jedoch voneinander (Abb. 38). Diese unterschiedliche Lage der Absorptionsmaxima war sowohl bei Verwendung von Kulturfiltraten als auch von in besonderer Weise aufbereiteten Überständen beider Stämme (Methoden s. BERNAERTS und DE LEY 1961) festzustellen. Es müßten demnach chemische Unterschiede vorliegen.

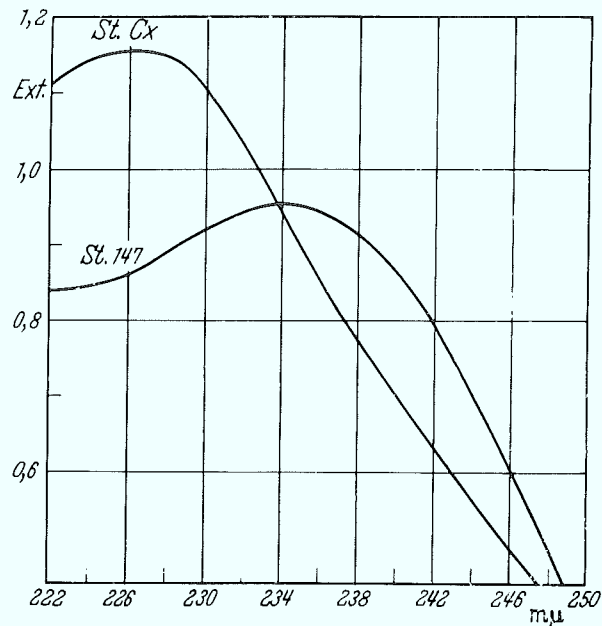


Abb. 38 Semicarbazid-Reaktion, UV-Absorptionsspektren der Reaktionsansätze mit Lactose-Abbauprodukten von St. 147 und St. Cx.

Wir konnten schließlich durch papier- und dünnschichtchromatographische Untersuchungen an Konzentraten präparativ gewonnener Lactose-Abbauprodukte beweisen, daß St. Cx keine 3-Ketolactose bildet, während diese Substanz bei St. 147 eindeutig nachweisbar ist. Der positive Ausfall des L-Tests, d.h. die Reduktion von Cu^{++} (s.S. 70), muß demnach andere Ursachen haben. Wie zweidimensionale Trennungen auf Dünnschichtplatten (Kieselgel nach STAHL) zeigen (Abb. 39), weist St. 147 neben 3-Ketolactose (a) noch eine weitere mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) reagierende, reduzierende Substanz (b) auf, die nach der Lage auf dem Chromatogramm mit dem unbekanntem (nicht identifiziertem) Stoff bei St. Cx identisch sein könnte. Diese beiden Substanzen lassen sich durch Besprühen mit Harnstoff-Phosphorsäure (WISE et al. 1955) klar voneinander unterscheiden: 3-Ketolactose ergibt einen roten Farbton mit der Tendenz zu Braun, während die St. 147 und St. Cx gemeinsame Verbindung (b) sich bläulich färbt.

Bei St. C war dagegen mit TTC nur ein schwach gefärbter Fleck zu sehen, der mit Lactose identisch ist.

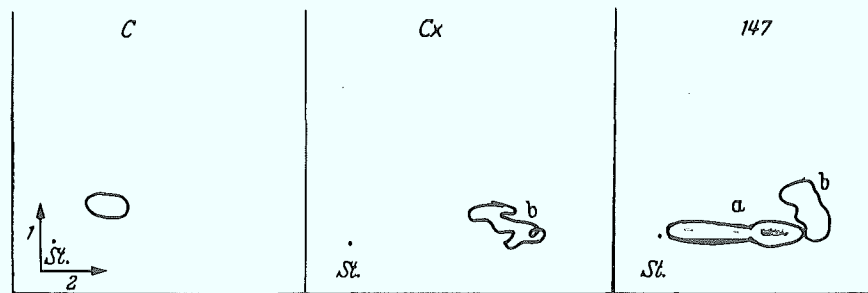


Abb. 39 Zweidimensionale Trennungen (Dünnschichtchromatographie) von Lactose-Abbauprodukten; St = Startpunkt; a = 3-Ketolactose; b = nicht identifizierte Substanz; 1 = 1. Laufrichtung: 90% Phenol; 2 = 2. Laufrichtung: Pyridin-Äthylacetat-Essigsäure-H₂O (5:5:3:1 v/v; besprüht mit Triphenyltetrazoliumchlorid).

Wir konnten somit zeigen, daß St. Cx zwar in der Erzeugung der nicht identifizierten Substanz (Abb. 39) St. 147 ähnelt, aber unter den Versuchsbedingungen keine 3-Ketolactose bildet. St. Cx hat offensichtlich nicht den für *A. tumefaciens* typischen Abbaumechanismus übernommen. Dieser Befund gewinnt einerseits Bedeutung für die Unterscheidung zwischen St. Cx und St. 147 und zeigt andererseits interessante Beziehungen auf, die möglicherweise für genetische Untersuchungen wichtig sein können. Darüber hinaus aber läßt diese Feststellung gewisse Zweifel an der von BERNAERTS und DE LEY (1963) vorgeschlagenen Nachweismethode virulenter Agrobacterien aufkommen. Die von diesen Autoren gemachte Annahme, die Bildung von 3-Ketolactose und anderer 3-Ketoglykoside wäre auf die Gattung *Agrobacterium* beschränkt und deshalb für die Diagnose von *A. tumefaciens* und *A. radiobacter* geeignet, ist nicht unwidersprochen geblieben. Wie Untersuchungen von GREBNER et al. (1964) zeigen, ist die Bildung solcher

Verbindungen auch bei *Micrococcus* sp. nachzuweisen. Sieht man jedoch davon ab, so ist im vorliegenden Falle festzustellen, daß der positive L-Test keineswegs nur 3-Ketolactose anzeigt. Bei einer praktischen Anwendung dieser Methode müßten zusätzliche spezifischere Nachweise geführt werden.

Es erhebt sich dabei die grundsätzliche Frage, ob Bildung oder Nichtbildung von 3-Ketoglykosiden ein verlässlicher Indikator für die Pathogenität von *A. tumefaciens* sein kann. In systematischen Untersuchungen an einer Reihe verschiedener Stämme von *A. tumefaciens*, *A. radiobacter* und von *A. rhizogenes* konnten wir die Unspezifität des L-Tests erhärten und an strahleninduzierten Mutanten von St. 147 nachweisen, daß die Bildung von 3-Ketoglykosiden nicht im kausalen Verhältnis zur Virulenz steht (KERN 1966).

4. Resistenz gegen Antibiotica

Für den Nachweis genetischer Veränderungen bei Bakterien, wie sie durch Mutationen oder in unserem Falle durch Transformationen entstehen, benutzt man häufig die Resistenz gegenüber Antibiotica als ein relativ leicht zu erkennendes Merkmal. Da die Antibioticaresistenz wiederum oft nur durch einen oder wenige Genorte des jeweiligen Genoms bestimmt wird, kann sie als genetischer "Marker" bei der Lokalisierung interessierender Eigenschaften verwendet werden. Gerade bei Transformationsversuchen finden Antibiotica Anwendung bei der Klärung der genetischen Kontrolle der Resistenz gegenüber den betreffenden antibakteriellen Agenzien (SCHAEFFER 1964).

Wie aus Abb. 40 hervorgeht, bestehen deutliche Unterschiede in der Resistenz gegenüber Streptomycin zwischen Donator, Acceptor und Transformant. Es handelt sich hierbei um eine sog. Gradientenplatte (SZYBALSKI 1952). Diese wird hergestellt, indem Petrischalen mit Mannit-Agar (20 ml) beschickt und vor dem Erstarren des Gels schräggestellt werden, so daß das äußerste Ende der Agarschicht gerade an

den Rand der Platte ausstreicht. Diese Schrägagar-Platten werden nach dem Erstarren des Agars mit 20 ml streptomycinhaltigem Agar übergossen und in waagerechter Lage zum Erstarren gebracht. Auf der Oberfläche des Agars werden die zu prüfenden Bakteriensuspensionen in Richtung des so gebildeten Antibiotica-Gradienten, beginnend bei der dünnsten Schicht des aufgegossenen Streptomycin-Agars, strichförmig mit einer Impföse aufgetragen.

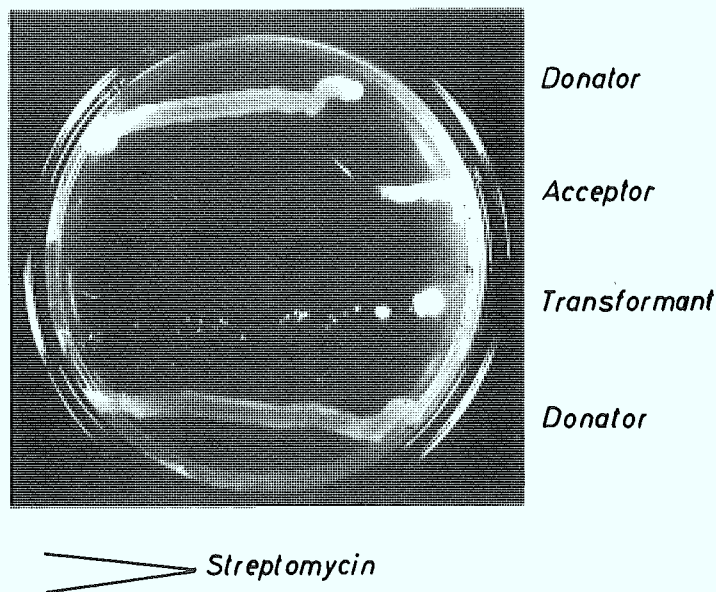


Abb. 40 Streptomycin-Gradienten-Platte; Donator = *A. tumefaciens* (St. 147); Acceptor = *Rhizobium leguminosarum* (St. C); Transformant = St. Cx.

Diese Methode erlaubt allerdings nur eine Schätzung der Streptomycin-Resistenz. Quantitative Bestimmungen der Resistenz gegenüber den in Tabelle 4 angeführten Antibiotica führten wir dagegen im Verdünnungstest in flüssigem Nährmedium durch (s. KLEIN 1957). Die Antibiotica kamen dabei in 1/15 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst zur Anwendung. Von den in "Pisum-Nährböden" (s. S. 67) bis zur logarithmischen Phase kultivierten Bakterien wurden je 1 ml Suspension

mit je 1 ml Antibioticallösung vereinigt und im Verdünnungstest nach 24 h Inkubation (28°C) die jeweilige Grenzkonzentration der antibakteriellen Aktivität der geprüften Substanzen ermittelt. Die in Tabelle 4 angegebenen Werte stellen Mittelwerte von mindestens fünf Ansätzen dar, die Konzentrationsangaben beziehen sich auf μ /ml.

Tabelle 4 Antibioticaresistenz

Antibioticum	St. 147	St. Cx	St. C
Streptomycin	250	125	62,5
Chloramphenicol	6	3	1,5
Aureomycin	50	50	50
Tetracyclin	12,5	6,25	3,13
Kanamycin	12	25	25
Penicillin	2500	2500	1250
Binotal	500	250	500
Colistin	6000	7000	2000
Actinomycin	70	80	90-100
Eleudron	500	500	250
Marbadal	250	1000	1000

Wie zu ersehen ist, nimmt St. Cx in seiner Resistenz gegenüber Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Actinomycin eine Mittelstellung ein. Im Falle Kanamycin und Marbadal besitzt St. Cx die gleiche Empfindlichkeit wie St. C, während sich bei Penicillin und Eleudron St. Cx und St. 147 gleichen. In seinem Verhalten gegenüber Binotal und Colistin jedoch weicht St. Cx von St. 147 und von St. C ab. Er zeigt eine reduzierte bzw. gesteigerte Resistenz.

Die Angaben über die Resistenz gegen die einzelnen Antibiotica beziehen sich, wie oben angegeben, auf die antibakterielle Aktivität dieser Stoffe innerhalb einer bestimmten Zeit (24 h). Dabei bleibt offen, ob es sich in den einzelnen Fällen um bacteriostatische oder bactericide Wirkungen handelt. Es sei hier auf die relativ hohe Resistenz aller

drei Bakterienstämme gegenüber Actinomycin hingewiesen. Wir konnten beobachten, daß unsere Bakterien sowohl in Flüssigkeits- als auch auf Agarkulturen in Gegenwart von Actinomycin in der angegebenen Grenzkonzentration nach 4 - 5 Tagen wieder ein geringes Wachstum zeigten.

5. Serologie

Zur weiteren Differenzierung unserer drei Bakterienstämme bedienten wir uns serologischer Methoden. Bekanntlich basieren diese auf der Reaktion zwischen Antigenen und ihren spezifischen Antikörpern. Bei letzteren handelt es sich um Serumglobuline, die als Reaktion auf die in das Versuchstier eingepflichten Antigene gebildet werden und sich durch eine hohe Spezifität auszeichnen. Typische Antigene gehören meist der Stoffklasse der Proteine und der Polysaccharide an. In unserem Falle verwendeten wir lebende Bakterien als Antigene, die, in Kaninchen eingepflicht, zur Bildung spezifischer Antikörper im Blutserum der Tiere führten. Die aus immunisierten Versuchstieren gewonnenen Antiseren benutzen wir für Antigen-Antikörper-Reaktionen *in vitro*, und beschränkten uns dabei auf die Agglutination und den Präzipitintest in Agar (OUCHTERLONY 1958). Die wichtigsten methodischen Punkte werden im folgenden beschrieben:

1. Gewinnung der Antiseren: Je ein Kaninchen (1 1/2 Jahr alt) wurden siebenmal mit je 2 ml lebender, in physiologischer Kochsalzlösung suspendierter Bakterien (5×10^9 Bakterien/ml) der entsprechenden Stämme in Abständen von 3 Tagen geimpft (Ohrvene). Die durch Ausbluten der so immunisierten Versuchstiere gewonnenen Seren, durch Zusatz von Merthiolat (1 : 10 000 g/v) konserviert, wurden bei 0°C aufbewahrt.

2. Präparation der Antigene: Für den Agglutinationstest wurden Bakterienkulturen ("Pisum-Nährmedium" s.S. 67) in der logarithmischen Wachstumsphase nach Abzentrifugieren in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und diese Suspension durch Filtration (Glasfritte) vom Schleim befreit. Bei den Präcipitintesten fanden die beiden folgenden Antigenpräparate Verwendung:

a) Ultraschall-Aufschlüsse von Bakterien in phosphatgepufferter (pH 7) physiologischer Kochsalzlösung. Hierzu wurde ein Ultraschallgerät (Fa. MSE, Modell 60W; mit einer Frequenz von 20kHz) benutzt. Bei maximaler Leistung des Gerätes betragen die Expositionszeiten 5 min. Die opaleszierenden Aufschlüsse wurden 15 min bei ca. 2000 x g zentrifugiert.

b) Trichloressigsäureextrakte (HOBBS et al. 1964) aus abzentrifugierten Bakteriensedimenten. Die einzelnen Proben wurden dabei in wenig 5%iger Trichloressigsäure (TCE) (g/v) suspendiert und bei häufigem Schütteln ca 20 h im Kühlraum (+ 4°C) aufbewahrt, dann abzentrifugiert, die Überstände 24 h gegen dest. Wasser dialysiert und mit NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

3. Die Agglutinationsteste erfolgten im Reagenzglas und auf Objektträgern (STAPP 1958, S. 60; van der VEKEN et al. 1962). Hierbei waren die Bakterien in physiologischer gepufferter Kochsalzlösung suspendiert.

4. Die Präcipitinteste wurden nach der Methode von OUCHTERLONY (1958) durch Doppeldiffusion in zwei Dimensionen (s. auch van der VEKEN et al. 1962) durchgeführt. Es fanden planbödige Diffusionschalen (ϕ 6 cm) Verwendung, die mit 1,5%igem Agar in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von Merthiolat (1 : 10 000 g/v) und Verwendung einer Siebenlochstanze beschickt wurden. Die Auswertung der Platten erfolgte nach einer Inkubation von 2 - 3 Tagen bei 25°C. In den meisten Fällen befand sich das jeweilige Antiserum im großen zentralen Reservoir, die Antigenpräparate in den 6 peripheren kleinen Löchern. Die Präcipitationsbanden wurden entweder durch Zeichnung oder durch Kontaktphotographie protokolliert.

Zunächst führten wir den Agglutinationstest mit den entsprechenden Antiseren durch. Der Agglutinationstiter betrug bei St. 147 1 : 4000; bei St. Cx 1 : 1000 und bei St. C 1 : 2000. Bei diesen Untersuchungen war immer nur die spezifische Agglutination zu beobachten, in keinem Falle erfolgte eine Reaktion mit den heterologen Antiseren. Die drei Bakterienstämme erwiesen sich demnach als selbständige serologische Typen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen wir bei Anwendung der Diffusionsmethode nach OUCHTERLONY (1958 s. oben). Wir verwendeten dabei zwei verschiedene Antigenpräparate. Diese wurden einmal durch Ultraschallaufschluß suspendierter Bakterien und außerdem mit Trichloressigsäure aus Bakteriensedimenten gewonnen. Im ersten Falle nehmen die im Aufschluß vorhandenen Proteine, Polysaccharide u. a. mit

Antigencharakter an der Antigen-Antikörper-Reaktion teil. Es bilden sich dann auch entsprechend mehr Präcipitationsbanden aus. Da aber die Bakterien Schleim bilden, der ein Polysaccharid ist (s. S. 21 ff.), dürfte ein großer Teil der Antigene dieser Stoffklasse angehören. Daher schien eine Fraktionierung angebracht. Durch die Extraktion der Bakterien mit Trichloressigsäure werden makromolekulare Eiweißkörper weitgehend eliminiert, so daß die löslichen antigenisch wirksamen Stoffe sich vorwiegend aus Polysacchariden zusammensetzen (HOBBS et al. 1964).

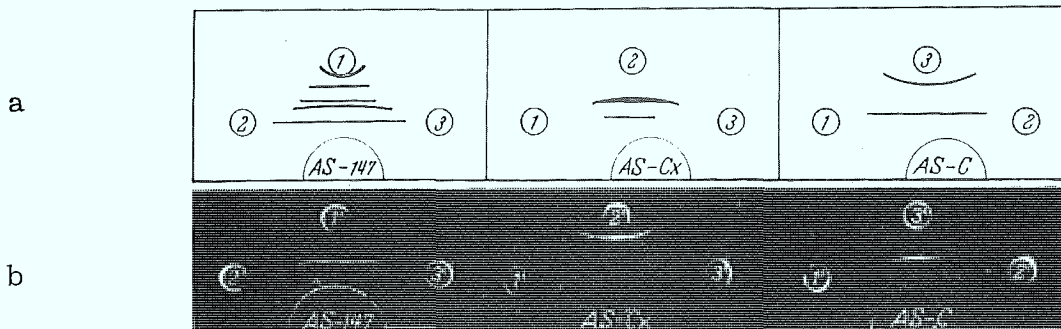


Abb. 41 Diffusionstest nach OUCHTERLONY: In der Reihe a wurden die Antigene durch Ultraschallaufschluß und in Reihe b durch Extraktion mit TCE gewonnen.
Bezeichnungen: AS-147 = Antiserum St. 147; AS-Cx = Antiserum St. Cx; AS-C = Antiserum St. C; 1 = Antigen St. 147 (Ultraschall); 1' = Antigen St. 147 (TCE); 2 = Antigen St. Cx (Ultraschall); 2' = Antigen St. Cx (TCE); 3 = Antigen St. C (Ultraschall); 3' = Antigen St. C (TCE).

In Abb. 41a sind die bei Diffusion in Agar auftretenden Präcipitationsbanden schematisch wiedergegeben, die bei der Reaktion von Antigenpräparaten durch Ultraschallaufschluß mit den entsprechenden Antiseren auftreten. Im zentralen Reservoir befindet sich das Antiserum, die kleinen peripheren Löcher - von denen hier nur drei abgebildet wurden - sind mit den Antigenpräparaten beschickt. Sieht man von einer unspezifischen, sehr schwachen Bande ab (nicht abgebildet), die nur bei

Verwendung konzentrierter Antigenpräparate auftrat, so können auch hier nur homologe Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden. Bei St. 147 sind bis zu fünf, bei St. Cx und St. C zwei Präcipitationsbanden festzustellen, die, wie in dem Schema angedeutet wird, unterschiedlich stark ausfallen. Wurden in gleicher Weise Trichloressigsäureextrakte aus den Bakterienstämmen gegen die einzelnen Antiseren geprüft, so konnten wir in jedem Falle nur eine spezifische Niederschlagsbande feststellen (Abb. 41 b). Ein Vergleich mit Abb. 41 a macht es wahrscheinlich, daß sie mit einer der Hauptbanden identisch sein dürfte.

Diese serologischen Methoden ermöglichen somit eine klare Differenzierung unserer drei Bakterienstämme. Wie in Kapitel IV gezeigt werden soll, sind Transformanten, die aus der Transformation zwischen *A. tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum* hervorgehen, jedoch keineswegs immer serologisch selbständige Typen.

6. Strahlenresistenz als genetisches Merkmal

In Ergänzung zu den bisher beschriebenen charakteristischen Eigenschaften wurde die Resistenz gegen Röntgenstrahlen als weiteres genetisch fixiertes Merkmal (ADLER und COPELAND 1962; GUNTER und KOHN 1955; PUTTE et al. 1963 u. a.) in die vergleichenden Untersuchungen mit einbezogen. Unter der Voraussetzung, daß die Bestimmung der Radiosensibilität an Bakterienkulturen erfolgt, die sich im gleichen physiologischen Zustand befinden, spiegeln die Überlebenskurven Unterschiede in der genetischen Konstitution wider.

Für die Bestimmung der Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen kultivierten wir unsere Bakterienstämme in "Pisum-Nährlösung" (s. S. 67) bis zur logarithmischen Wachstumsphase. Diese ermittelten wir aus Wachstumskurven, die durch Extinktionsmessungen (E490) an wachsenden Flüssigkeitskulturen und gleichzeitiger Bestimmung der Bakterienzahl (Zählkammer) zu verschiedenen Zeitpunkten aufgestellt wurden. Zur weiteren Sicherung, daß die für die Bestrahlungen verwendeten Bakterien in der log-Phase vorlagen, prüften wir an den Suspensionen die Normalverteilung der Zellgrößen (vergl. S. 63). Hierfür wurden

hitze-fixierte und gefärbte Ausstriche photographiert und in den vergrößerten Aufnahmen Längenmessungen - in einigen Fällen auch Breitenmessungen - an den Bakterien vorgenommen. Die exponentiell als Summenkurve aufgetragenen Werte ergaben für Kulturen in der log-Phase eine Gerade (WEBER 1957; s. S. 76).

Zur Bestrahlung wurden die Bakterien abzentrifugiert, in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7) suspendiert und in Portionen von je 0,5 ml in gekittete Glasschälchen eingebracht. Die Schälchen standen unter einer Glasplatte auf einem in Eiswasser stehenden Metallblock. Bei Verwendung eines 1,7 mm Al-Filters betrug die Dosisleistung bei 100 kV und 18 mA, einem Abstand von 10,5 cm von der Probe und bei Berücksichtigung der Absorption der Glasplatte und der Rückstreuung 1054 r/min. Die Überlebensraten bei den verschiedenen Dosen ermittelten wir im Plattenverfahren und benutzten hierbei "Pisum-Agar". Die Bakterienkulturen wurden nach drei Tagen an je vier Platten pro Dosis ausgezählt. Nach Auftragen der prozentualen Überlebensraten auf der logarithmischen gegen die Röntgendosis auf der arithmetischen Skala konnten die Dosen, bei denen 37 % (Letaldosis LD₃₇) bzw. 50 % (LD₅₀) der bestrahlten Bakterien absterben, aus den Kurven abgelesen werden (Abb. 42 und Tabelle 5).

Aus noch zu besprechenden Gründen bestimmten wir ferner an Bakterien in der log-Phase den Gehalt an DNA, RNA und an Protein je Zelle. Hierfür wurden aliquote Volumina der Bakteriensuspensionen im Zentrifugenglas mit 5 M Perchlorsäure (HClO₄) unter gleichzeitigem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M HClO₄ versetzt. Nach 30 min wurde abzentrifugiert und das Sediment nacheinander wie folgt behandelt: einmal Waschen mit kalter 0,5 M HClO₄, zweimalige Extraktion mit 0,2 M HClO₄ in 50%igem Äthanol (KERN 1959), Suspendieren in Äther-Äthanol (1 : 3 v/v) und Inkubation (ca. 16 h) bei Zimmertemperatur. Dann erfolgte die Extraktion der Nucleinsäuren (DNA + RNA) aus dem mit Äthanol gewaschenen Sediment mit 0,5 M HClO₄ bei 70°C und einer Dauer von 40 min. Von diesem in Meßkölbchen aufgefüllten HClO₄-Extrakt wurden je 2 ml für die DNA-Bestimmung nach BURTON (1956) und entsprechende Anteile für die Bestimmung des Gesamtphosphors (vergl. S. 20) nach der Methode von BERENBLUM und CHAIN (1938) verwendet. Den RNA-Gehalt berechneten wir aus der Differenz zwischen dem Gesamtphosphor minus DNA-P, wobei wir die kolorimetrisch bestimmte Menge an DNA mit einem DNA-P-Gehalt von 8 % in Rechnung setzten. Die RNA-Mengen beziehen sich auf einen angenommenen RNA-P-Gehalt von 9 %. Nach erfolgter Extraktion der Nucleinsäuren wurde der Rückstand in 1 M NaOH durch Erhitzen auf 60°C (10 min) gelöst. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 ml dieser Lösung nach entsprechender Verdünnung mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt und nach 15 min die Absorption dieser Ansätze bei 310 m μ und 390 m μ gegen eine Vergleichslösung abgelesen (ZAMENHOF und CHARGAFF; s. ZAMENHOF 1957, S. 702). Die Proteinbestimmungen basieren auf einer von Albumin (aus Rinderserum, Cohn Fraktion V, Serva, Heidelberg) angefertigten Eichkurve. Die Methoden zur Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNA aus den Bakterienstämmen werden später beschrieben (S. 94 ff.).

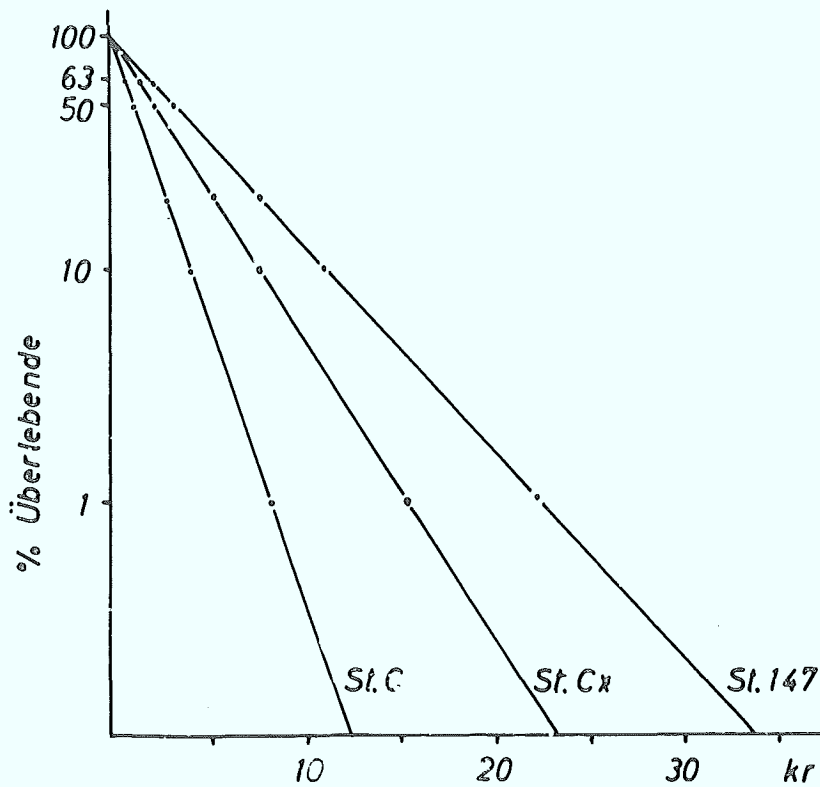


Abb. 42 Strahlenempfindlichkeit von Donator (St. 147), Transformant (St. Cx) und Acceptor (St. C). Abzisse (arithmetische Skala): Röntgendosen in kr; Ordinate: (logarithmische Skala): Prozent der Überlebenden. 63 % Überlebende = LD₃₇; 50 % Überlebende = LD₅₀.

Tabelle 5 Strahlenresistenz

Stamm	LD ₃₇	LD ₅₀	G-C% ¹	DNA/ Zelle (10 ⁻¹² g)	RNA/ Zelle (10 ⁻¹² g)	Protein/ Zelle (10 ⁻¹² g)	DNA/RNA	RNA/ Protein
147	2300r	3450r	57,8	10,0	12,6	121,0	1:1,26	1: 9,6
Cx	1700r	2500r	58,6	12,8	11,2	165,0	1:0,90	1:14,7
C	900r	1400r	59	16,6	18,4	163,0	1:1,10	1: 8,8

¹ Die Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNA erfolgte an papierchromatographisch getrennten Ameisensäurehydrolysaten (vergl. S. 94).

Aus dem Verlauf der Überlebenskurven (Abb. 42) ist zu erkennen, daß sich die drei Bakterienstämme in ihrer Strahlensensibilität voneinander unterscheiden. Auch hier wird deutlich, daß der Transformant (St. Cx) bezüglich seiner genetisch fixierten Strahlenempfindlichkeit eine Mittelstellung zwischen Acceptor (St. C) und Donator (St. 147) einnimmt. Aus Tabelle 5 sind diese Verhältnisse klar zu ersehen. Hier wurde als Maß für die Strahlenempfindlichkeit der drei Bakterienstämme sowohl die LD₃₇ als auch die LD₅₀ eingetragen. Die dort angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus fünf Wiederholungen dar. Die Streuung der Mittelwerte beträgt $\pm 5\%$. Somit liegt in der Resistenz gegen Röntgenstrahlen ein weiteres Merkmal zur Differenzierung der hier untersuchten Bakterienstämme vor. Wir können den Schluß ziehen, daß bei der genetischen Transformation u. a. auch die Strahlenresistenz übertragen wurde.

Die Strahlenresistenz ist jedoch Ausdruck komplexer physikalisch-chemischer Vorgänge, die in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand des Organismus zu biologischen Schädigungen führen, die den Tod der Zelle zur Folge haben können. Bei Mikroorganismen wird daher die Überlebens- oder Absterberate als Maß für Strahlenschäden benutzt. Zu den Faktoren, welche die Strahlenresistenz wesentlich beeinflussen, gehören sowohl die Quantität, als auch die Qualität der DNA der Zelle. Das geht aus Untersuchungen an zahlreichen Arten höherer Pflanzen (SPARROW und EVANS 1961), an Viren (EPSTEIN 1953; STENT 1958), als auch an Bakterien hervor. Bei letzteren wurde ein Zusammenhang zwischen Gehalt an DNA und auch an RNA pro Bakterienzelle und der Strahlenresistenz gefunden (PUCK 1960; TERZI 1961; KAPLAN und MOSES 1964). Darüberhinaus ließ sich bei Bakterien eine Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Guanin-Cytosin-Gehalt in der DNA nachweisen. Nach den Ergebnissen von KAPLAN und ZAVARINE (1962) ist eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit mit einem höheren Gehalt an Guanin-Cytosin korreliert.

Unsere Untersuchungen (Tabelle 5) lassen klar erkennen, daß mit einem höheren DNA-Gehalt je Bakterienzelle auch eine höhere Strahlen-

empfindlichkeit verbunden ist. Damit steht dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit den Befunden und Forderungen von TERZI (1961) und KAPLAN und MOSES (1964). Der RNA- und der Proteingehalt und demzufolge auch die Relation DNA/RNA und RNA/Protein lassen dagegen in unserem Falle keine Zuordnung zur jeweiligen Strahlenresistenz erkennen (Tabelle 5). In bezug auf die von KAPLAN und ZAVARINE (1962) gefundene Relation zwischen Basengehalt (G-C, s. oben) und Strahlenresistenz wird diese Tendenz auch aus unseren Ergebnissen erkennbar. (Tabelle 5). Einem größeren Anteil der Basenpaare Guanin-Cytosin an der Zusammensetzung der DNA aus den drei Bakterienstämmen läßt sich eine höhere Strahlenempfindlichkeit zuordnen.

Angesichts der nur geringen Unterschiede im G-C-Gehalt der einzelnen DNA-Sorten (vergl. Tabelle 7, S. 90) erhebt sich die Frage, ob unsere Befunde tatsächlich diese Korrelation wiedergeben. Diese Zweifel erschienen uns berechtigt, da KAPLAN und ZAVARINE ihre Untersuchungen an acht Bakterienarten durchführten (*Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Serratia marcenscens*, *Azotobacter agile*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* und *Micrococcus pyogenes*), die verschiedenen Verwandtschaftskreisen angehören und zudem große Unterschiede im G-C-Gehalt der betreffenden DNA aufweisen. Das Spektrum des G-C-Gehaltes reicht von 30 bis 66 %, während in unserem Falle nur eine Differenz von höchstens 2 % festzustellen war. Wenn aber die lineare Beziehung zwischen G-C-Gehalt und Strahlenresistenz eine allgemeine Erscheinung ist, dann müßte diese auch bei Bakterien nachzuweisen sein, die genetisch in enger Beziehung zueinander stehen, sich aber in ihrer Strahlenempfindlichkeit voneinander unterscheiden.

Um dieser Frage nachzugehen, führten wir gemeinsam mit Herrn Dr. H. P. MÜLLER (Institut für Genetik, Universität Bonn) Untersuchungen an strahleninduzierten Mutanten zweier Stämme von *Azotobacter chroococcum* durch (MÜLLER 1966). Dabei wurde sowohl der DNA-Gehalt pro Zelle als auch der prozentuale Anteil an Guanin-Cytosin der betreffenden DNA bestimmt und in Beziehung zur Strahlenresistenz der jeweiligen Bakterienstämme gesetzt. Als Maß für die Strahlensensibili-

tät wurden die LD₃₇ und die LD₉₀ verwendet. Die Ergebnisse werden demnächst veröffentlicht (MÜLLER und KERN, in Vorbereitung). Sie sollen hier nur als Ergänzung der bei unseren Untersuchungen berührten Frage angeführt werden, inwieweit Qualität und Quantität der DNA in Beziehung zur Strahlenresistenz stehen.

In Tabelle 6 sind die Befunde dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 6: Gehalt und Basenzusammensetzung der DNA unterschiedlich strahlenresistenter Mutanten von *Azotobacter chroococcum*.
(C₇₆, C₇₇ = Ausgangsstämme; Az-Stämme = Mutanten)

Stamm Nr.	LD ₃₇ (kr)	LD ₉₀ (kr)	DNA-Gehalt/Zelle (μ)	GC-Gehalt (%)
C ₇₆	7.5	17.5	-	60.5
Az ₁₂	7.0	16.0	-	61.0
Az ₁₀₈	4.5	10.5	1.312×10^{-8}	63.5
Au ₁₃₀	3.0	7.0	-	63.3
Az ₁₃₅	10.5	>20.0	4.505×10^{-9}	64.5
Az ₉₂	13.0	>20.0	3.6015×10^{-9}	62.3
Az ₉₅	16.0	>20.0	1.0873×10^{-9}	62.3
C ₇₇	4.2	10.0	-	65.5
Az ₁₄	4.0	10.5	-	63.9
Az ₅₅	3,5	8.0	1.968×10^{-8}	62.8
Az ₄₄	2.8	6.5	3.616×10^{-8}	63.4
Az ₃₃	2.5	5.5	-	64.2
Az ₄₆	1.5	4.0	-	66.3
Az ₆₀	9.0	>20.0	3.6625×10^{-9}	65.0
Az ₇₆	11.0	>20.0	6.329×10^{-10}	63.8
Az ₇₈	13.0	>20.0	4.9155×10^{-11}	59.3

Nach den bereits erwähnten Untersuchungen von KAPLAN und MOSES (1964) sowie KAPLAN und ZAVARINE (1962; s. S. 83 ff.) an verschiedenen Bakterienarten ist die Strahlenresistenz mit steigendem DNA-Gehalt und GC-Anteil erniedrigt. Es wurde deshalb das in Tabelle 6 aufgeführte Zahlenmaterial einer linearen Korrelations- und Regressionsanalyse unterworfen, um die Frage zu klären, ob bei den strahleninduzierten Mutanten von *Azotobacter chroococcum* eine Abhängigkeitsbeziehung zwischen dem DNA-Gehalt pro Zelle, dem GC-Anteil der DNA und der Strahlensensibilität besteht.

Für die Abhängigkeitsbeziehungen zwischen den genannten Faktoren ergaben sich folgende Bestimmtheitsmaße und Regressionsgleichungen:

	Bestimmtheitsmaß	Regressionsgleichungen
DNA-Gehalt/Zelle- Strahlenresistenz (LD ₃₇)	0.8390 ⁺⁺⁺	$y = 20.3036 - 1.4427 x$ ⁽¹⁾ $x = 13.2981 - 0.5816 y$
GC-Gehalt (%) der DNA-Strahlenresistenz (LD ₃₇)	0.2732 ⁺	$y = 65.0476 - 0.2315 y$ ⁽²⁾ $x = 81.8976 - 1.1801 y$
GC-Gehalt (%) der DNA-Strahlenresistenz (LD ₉₀)	0.2706 ⁺	$y = 65.6593 - 0.1668 x$ $x = 116.3448 - 1.6623 y$

(1): Der Wert x hat die Dimension: 10 log LD₃₇ (kr), y die Dimension 10 log DNA-Gehalt/Zelle (μ).

(2): Der Wert x hat die Dimension: Dosis (kr)-LD₃₇, y die Dimension GC-Gehalt in Prozent.

Die Berechnungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. F. WEILING, Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Universität Bonn, mit Hilfe der Großrechenanlage IBM 7090 im Institut für Instrumentelle Mathematik der Universität durchgeführt. Herrn Prof. Dr. WEILING sei an dieser Stelle herzlich für seine Unterstützung gedankt.

Diese Berechnungen lassen erkennen, daß auch zwischen den unterschiedlich strahlenresistenten Mutanten zweier Bakterienstämme, deren GC-Gehalt zwischen 59 und 66 % variiert, unter einheitlichen Bestrahlungsbedingungen die Strahlensensibilität in linearer Beziehung sowohl zum Gesamt-DNA-Gehalt als auch zum prozentualen Anteil der G-C-Basenpaare steht.

Die in den Abbildungen 43 und 44 dargestellten Contourellipsen, innerhalb derer die Meßpunkte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegen, verdeutlichen die in der Tabelle 6 zusammengestellten Ergebnisse.

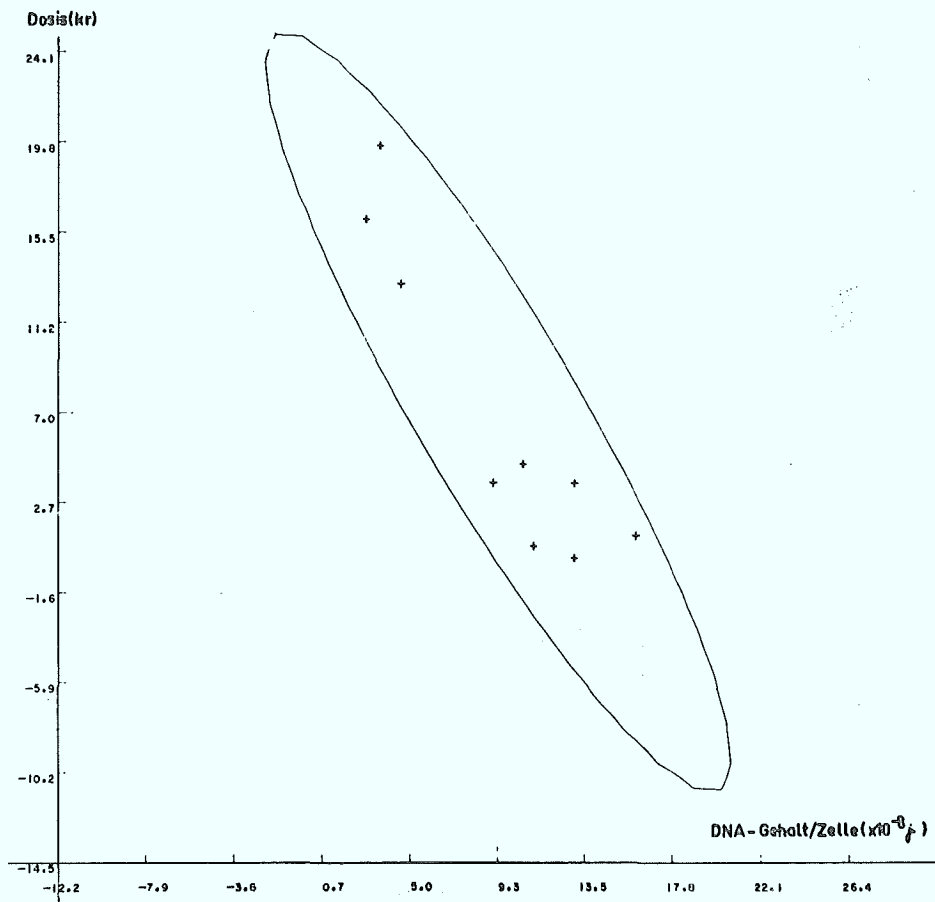


Abb. 43 Contourellipse für die Beziehung zwischen dem DNA-Gehalt/Zelle und der Strahlenresistenz (LD₃₇) von Azotobacter-Stämmen (vergl. Tabelle 6).

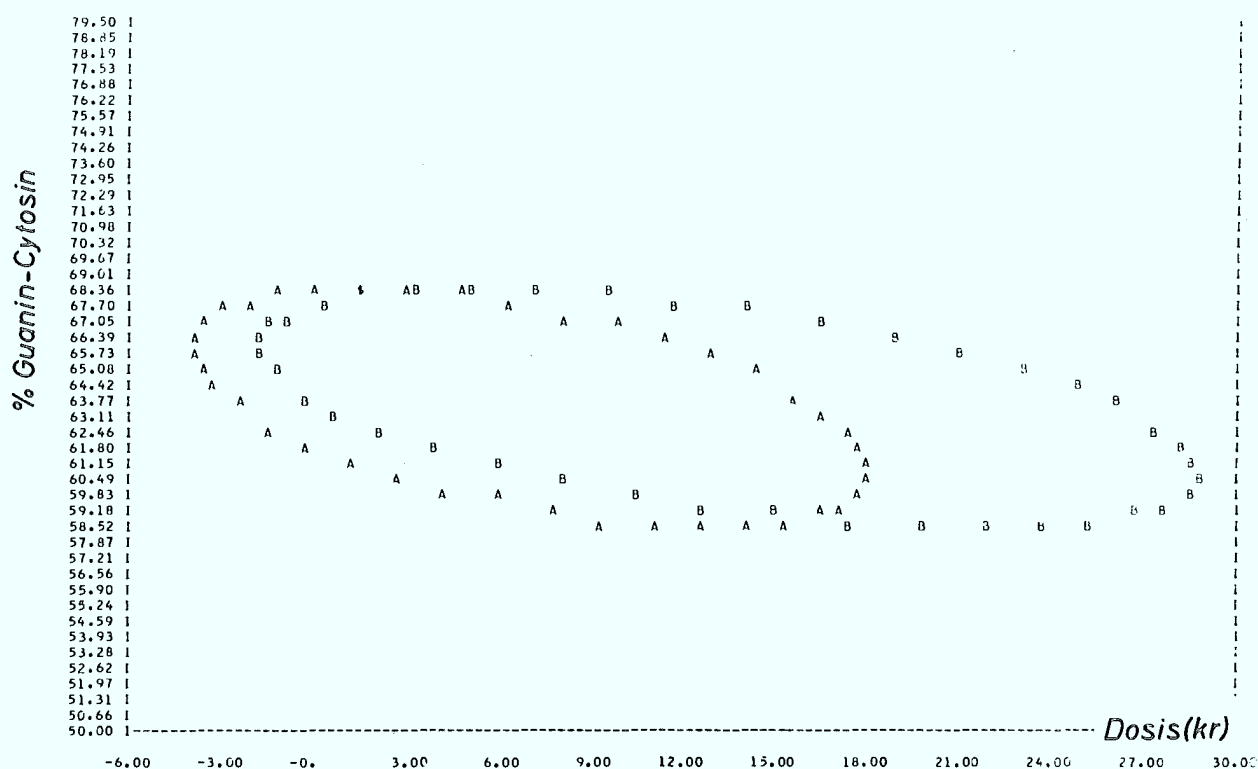


Abb. 44 Contourellipse (die Meßpunkte sind nicht eingetragen) für die Beziehung zwischen dem Anteil der Guanin-Cytosin-Basenpaare in der DNA und der Strahlenresistenz von *Azotobacter*-Stämmen (vergl. Tab. 6). Die mit A gekennzeichnete Ellipse gibt die Beziehung zwischen G-C und LD₃₇ und die mit B bezeichnete die Beziehung zwischen G-C und LD₉₀ wieder.

Geht man von der Hypothese aus, daß DNA der bevorzugte Ort für die inaktivierende bzw. tötende Wirkung der Röntgenstrahlen ist ("Target"-Theorie), so ist die Beziehung zwischen DNA-Gehalt der Zelle und ihrer Strahlenempfindlichkeit verständlich (vergl. Tabelle 5 und Abb. 43). Zur Erklärung der unterschiedlichen Strahlenresistenz bei Organismen mit verschiedenem Gehalt an Guanin-Cytosin in ihrer DNA diskutieren KAPLAN et al. (1964) zwei Hypothesen:

1. Das Basenpaar Guanin-Cytosin, als Bestandteil der makromolekularen DNA, ist gegenüber dem Basenpaar Adenin-Thymin per se strahlenempfindlicher. Die Folge davon ist, daß mehr Läsionen pro Strahlendosis in G-C-reicher DNA hervorgerufen werden.

2. Kann ein enzymatischer Restaurierungsmechanismus für Röntgenschäden existieren, der mit dem bei UV-Schäden nachgewiesenen vergleichbar ist. Läsionen in G-C-reicher DNA wären demnach gegenüber DNA mit einem höheren Anteil an A-T-Basenpaaren in geringerem Maße reparabel.

Nach Ansicht von KAPLAN et al. (1964) schließen sich diese beiden Alternativen nicht gegenseitig aus. Die radiochemische Labilität aller vier Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin), gleichgültig ob sie als freie Basen, als Nucleoside, Nucleotide oder in der DNA in vitro bestrahlt werden (s. HAYNES 1964), ist jedoch gleich groß. Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit könnte ihre Ursache darin haben, daß unbekannte radiolytische Produkte von Guanin oder Cytosin die Inaktivierung der Zelle herbeiführen oder Nucleasen freigesetzt werden, die bevorzugt Phosphordiesterbindungen in G-C-Regionen der DNA lösen (HAYNES 1964).

Unsere an Azotobacter-Stämmen gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Korrelation zwischen G-C-Gehalt der DNA und Strahlenempfindlichkeit der betreffenden Mikroorganismen. Diese Beziehung kann, entsprechend der Ansicht von KAPLAN et al. (1964), eine allgemeine Erscheinung sein. Es darf daher angenommen werden, daß die bei den Vergleichen zwischen St. 147, St. Cx und St. C angedeutete Tendenz (Tabelle 5) Ausdruck dieser Korrelation ist.

C. Untersuchungen an der DNA aus Donator, Acceptor und Transformant

Die dargelegten vergleichenden Untersuchungen an den Partnern der genetischen Transformation machen deutlich, daß zwischen den einzelnen Stämmen morphologische und physiologisch-chemische Unterschiede bestehen, die als Ausdruck genetischer Verschiedenheit zu werten sind. Der transformierte Stamm (St. Cx) hat nicht nur die Fähigkeit zur Tumorinduktion an Pflanzen erlangt, sondern er wurde auch in anderen, hier untersuchten Eigenschaften so verändert, daß er zwischen denen des Donators und des Acceptors intermittiert.

Die Transformation hat zur Voraussetzung, daß Teile der DNA des Donators in das Genom des Acceptors integriert werden. Den dadurch bedingten Veränderungen des Acceptors müssen demnach auch qualitative Unterschiede in der DNA zugeordnet sein. Über unsere Versuche, derartige Unterschiede in der DNA aus den Partnern der Transformation herauszufinden, wird nun berichtet.

1. Physikalisch-chemische Charakterisierung der DNA-Präparate

Die aus Kulturen von St. 147, St. Cx und von St. C in gleicher Weise gewonnenen DNA-Präparate (Methode s. S. 17 ff.) tragen die Bezeichnungen DNA-147, DNA-Cx bzw. DNA-C. Zunächst wurden sie chemisch charakterisiert und dabei der Gehalt an Phosphor, RNA und Beimengungen an Protein in derselben Weise, wie bereits beschrieben (s. S. 20 ff.) bestimmt. Außerdem wurden auch die spektroskopischen Reinheitskriterien berücksichtigt (Tabelle 7).

Tabelle 7. Charakterisierung der DNA-Präparate

	% Phosphor	E ₂₆₀ /E ₂₃₂	E ₂₆₀ /E ₂₈₀	ε(P) 260m μ	% RNA	% Protein
DNA-147	8,4	2,10	1,80	6447	0,52	< 1
DNA-Cx	9,0	2,05	1,78	6066	0,14	< 1
DNA-C	8,9	2,04	1,81	6263	0,17	< 1

Die Werte wurden aus Dreifachbestimmungen von je drei Präparaten der jeweiligen Bakterienstämme gemittelt.

Bei ähnlichem Gehalt an Phosphor sind die Beimengungen an RNA und Protein in allen Präparaten sehr gering. Wir ließen hier den Gehalt an Polysacchariden unberücksichtigt, da er kaum einen Einfluß auf die Analysen haben dürfte. Der Quotient aus Absorptionsmaximum und -minimum (E_{260}/E_{232}) liegt in jedem Falle bei 2,0 und weist ebenso wie der Quotient E_{260}/E_{280} die gleiche spektroskopische Reinheit der betreffenden DNA nach. Auch liegt der auf der Basis von Phosphor errechnete atomare Extinktionskoeffizient $\xi(P)$ bei allen untersuchten Präparaten in gleicher Höhe und ist vergleichbar mit entsprechenden Angaben in der Literatur. (z.B. CHARGAFF und ZAMENHOF 1948; SAVITSKY und STAND 1966). Diese Daten zeigen, daß die auf gleiche Weise aus den verschiedenen Bakterienstämmen gewonnenen DNA-Präparate auch ähnliche Charakteristika aufweisen. Es ist anzunehmen, daß präparativ bedingte Veränderungen der nativen DNA (z.B. Reduktion des Molekulargewichtes u.a.) ebenfalls im gleichen Ausmaß erfolgen und daher vergleichende Untersuchungen an diesen Präparaten gerechtfertigt erscheinen.

In jedem Falle aber handelt es sich bei den DNA-Präparaten um ein heterogenes Gemisch verschieden großer DNA-Moleküle bzw. Fragmente derselben, die sich in ihrer Basenzusammensetzung und der Zahl der Wasserstoffbindungen zwischen den komplementären Basen unterscheiden können, (SUEOKA und CHENG, 1962). Um auch in dieser Hinsicht einen Einblick zu bekommen und möglicherweise hervortretende Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten zu erfassen, wurden säulenchromatographische Fraktionierungen der DNA vorgenommen. Wir führten Trennungen an mit methyliertem Albumin imprägnierten Kieselsäure (MAK) durch, entsprechend der Methode von SUEOKA und CHENG (1962). Solche MAK-Säulen ermöglichen eine Fraktionierung von DNA nach Molekulargewicht, Basenzusammensetzung und Gehalt an freien Wasserstoffbindungen.

Wir stellten MAK-Material nach der Vorschrift von SUEOKA und CHENG (1962) her, suspendierten es in 0,1 M gepufferter Kochsalzlösung und verwendeten, wenn nicht anders angegeben, je Säule 10 ml dieser Suspension: Nach Waschen der Säule mit 0,4 M gepufferter

NaCl-Lösung (pH 6,7) und Beschickung mit maximal 1000 μ g DNA (20 μ g/ml) wird der Säulendurchlauf quantitativ aufgefangen und dann nacheinander je Salzkonzentrationsstufe (0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 und 2,0 M gepufferte NaCl-Lösung) zweimal je 25 ml Lösung unter Druck durch die Säule getrieben und die Eluate ebenfalls quantitativ in Meßkölbchen aufgefangen. Die quantitative Bestimmung der DNA in den einzelnen Fraktionen erfolgte spektroskopisch mit Hilfe des Umrechnungsfaktors $0,02 \times E_{260}$ für 1 μ g native, d.h. doppelsträngige DNA/ml (Schichtdicke der Küvette 1 cm). Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde prozentual auf den als 100 % gesetzten Gesamtgehalt aller Fraktionen bezogen. Außer dieser diskontinuierlichen Fraktionierung führten wir auch kontinuierliche Trennungen an MAK-Säulen durch. Hierbei erfolgte die Eluierung mit einem linearen Salzgradienten von 0,4 - 1,4 M gepufferter NaCl-Lösung und der Verwendung eines automatischen Fraktionssammlers ("Radi-Rac", LKB, Stockholm).

DNA-Präparate eines jeden der drei Bakterienstämme wurden an MAK-Säulen durch schrittweise Eluierung mit diskontinuierlich ansteigenden Salzkonzentrationen fraktioniert. Wir stellten eine Bindung der DNA zu 85-97 % an das Säulenmaterial fest. Die Auswaschung des größten Teils der DNA erfolgte bei 0,6 und 0,7 M NaCl. Durch Waschen der Säule mit ausreichenden Mengen der betreffenden Pufferlösungen und deren spektroskopische Überprüfung konnten wir beide Fraktionen klar voneinander trennen (Abb. 45). Mit dieser Methode war kein Unterschied zwischen den einzelnen DNA-Präparaten festzustellen, auch dann nicht, wenn die Eluierung mit verringerten Konzentrationsabstufungen der NaCl-Lösungen erfolgte. Die Beschickung der Säule mit einem Gemisch der DNA der drei Bakterienstämme in ungefähr gleichen Anteilen ergab das in Abb. 45 wiedergegebene Eluierungsdiagramm. Die Verhältnisse entsprechen denen der getrennt für sich fraktionierten einzelnen DNA-Sorten. Die Auswaschung der DNA erfolgte hier wie bei der kontinuierlichen Fraktionierung im linearen Salzgradienten (Abb. 46) zwischen 0,6 und 0,7 M NaCl. Diese Befunde lassen erkennen, daß sich die DNA-Präparate entsprechend dem Trenneffekt einer MAK-Säule (s. oben) bezüglich ihres mittleren Molekulargewichtes und der Anzahl freier Wasserstoffbindungen ähnlich sind. Dies gilt allerdings nur, wenn auch die andere Voraussetzung, nämlich eine ähnliche summarische Basenzusammensetzung, erfüllt ist.

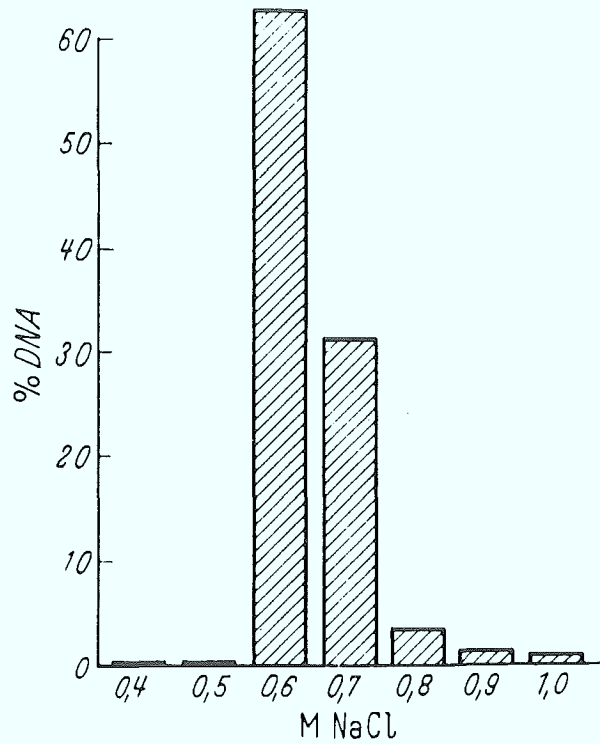


Abb. 45 Diskontinuierliche Fraktionierung eines Gemisches von DNA aus *A. tumefaciens* (422 μ g), *Rh. leguminosarum* (502 μ g) und aus *St. Cx* (513 μ g) durch Säulenchromatographie an methyliertem Albumin (MAK-Säule, 20 ml Suspension, s. methodische Angaben).

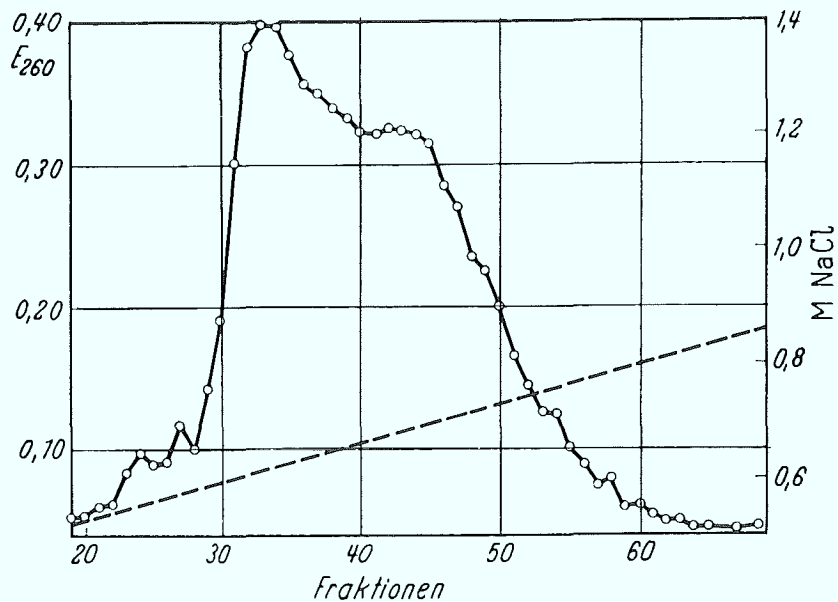


Abb. 46 Fraktionierung eines DNA-Gemisches (s. Abb. 45) an einer MAK-Säule mit einem linearen Salzgradienten 0,4 - 1,4 M NaCl).

2. Bestimmungen der Basenzusammensetzung

a) Papierchromatographische Untersuchungen an Säurehydrolysaten

Bei der konventionellen Basenbestimmung der DNA durch Papierchromatographie verfahren wir in folgender Weise: etwa 5 mg trockene DNA wird in maximal 0,5 ml konz. Ameisensäure gelöst und in einer abgeschmolzenen dickwandigen Pyrexampulle 30 min bei 175°C hydrolysiert. Das im Vakuum eingedampfte Hydrolysat wird in wenig 1 N HCl aufgenommen, auf Papierstreifen (Macherey, Nagel u. Co., Nr. 263) aufgetragen und mit Methanol-HCl-H₂O (7:2:1 v/v) eindimensional absteigend chromatographiert. Die im UV-Licht (Photoprint-Verfahren) auf den getrockneten Chromatogrammen lokalisierten Flecke der DNA-Basen (Abb. 47) werden ausgeschnitten, mit je 5 ml 0,1 N HCl eluiert und unter Verwendung entsprechender Vergleichslösungen die molaren Konzentrationen der Basen spektrophotometrisch bestimmt, wobei die entsprechenden millimolaren Extinktionskoeffizienten von WYATT (1955) benutzt wurden (umfassende Beschreibung der Methoden bei BENDICH 1957, S. 715 ff.).

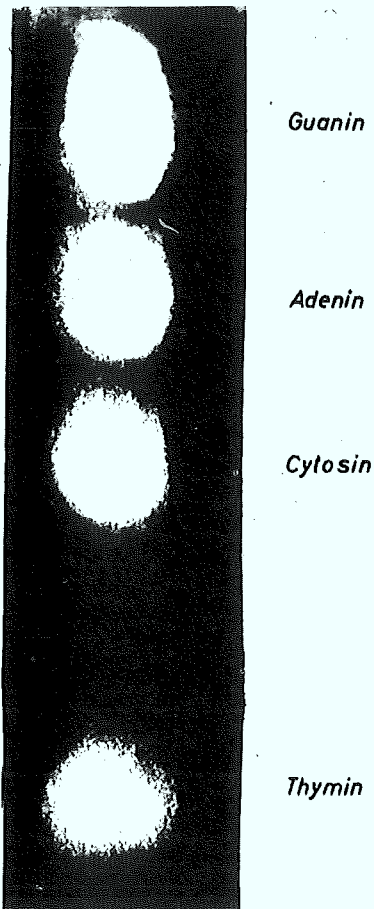


Abb. 47
Papierchromatographische
Trennung eines DNA-
Hydrolysates. Laufmittel:
Methanol-HCl-H₂O
(7:2:1 v/v). Lokalisierung
der Basen durch das
Photoprint-Verfahren im
UV-Licht.

In allen DNA-Präparaten ließen sich auf diese Weise nur die vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) nachweisen.

Aus dem quantitativ bestimmten molaren Basenanteil berechneten wir die in Tabelle 8 angeführten Relationen. Der Quotient Purin/Pyrimidin ($G + A / C + T$) liegt in jedem Falle bei 1. Auch sind die am C-6-Atom eine NH_2 -Gruppe tragenden Basen (Adenin und Cytosin) ebenso häufig vorhanden wie die Basen mit einer Ketogruppe am C-6-Atom (Guanin und Thymin). Der entsprechende Quotient $G + T / A + C$ liegt demnach ebenfalls bei 1. Beide Beziehungen stehen im Einklang mit den Gesetzmäßigkeiten des Watson-Crick-Modells der DNA. Bekanntlich kommt die Variabilität der DNA im unterschiedlichen Verhältnis der Basenpaare G-C und A-T zueinander, damit auch in der Relation von A zu G oder im molaren Prozentgehalt an G - C zum Ausdruck. Eine DNA kann man auch durch ihren Spezifitätsquotienten charakterisieren: $G + C / A + T$. Im vorliegenden Falle ist hierdurch ein geringer Unterschied von DNA-147 gegenüber den beiden in dieser Beziehung gleichen Präparaten DNA-Cx und DNA-C zu erkennen. Denszufolge sind auch im prozentualen Anteil des Basenpaares G - C am Aufbau der betreffenden DNA Differenzen festzustellen (Tabelle 8).

Tabelle 8. Basenzusammensetzung der DNA-Präparate

	G-C ¹ (T _m -Punkt) %	G-C ² (pH 3) %	G-C ³ (Chromatogr.) %	$\frac{G+A^3}{C+T}$	$\frac{G+T^3}{A+C}$	$\frac{G+C^3}{A+T}$
DNA-147 (4)	57,0	57,5	57,8	1,03	0,97	1,39
DNA-Cx (3)	57,5	59,7	58,6	1,01	0,97	1,45
DNA-C (4)	59,0	59,7	59,0	1,02	0,93	1,45

¹Die Bestimmung des T_m-Punktes erfolgte in Lösung d (siehe Tab. 9).

²Nach der Methode von FREDERICQ, OTH u. FONTAINE (1961).

³Aus papierchromatographisch ermittelten Werten berechnet, in Klammern die Anzahl der untersuchten Präparate.

b) Spektroskopische Bestimmungen an säuredenaturierter DNA

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Basenzusammensetzung ist in der von FREDERICQ, OTH und FONTAINE (1961) entwickelten spektroskopischen Methode gegeben. Sie geht davon aus, daß in 0,1 N Essigsäure (pH 3) gelöste DNA denaturiert wird und dabei die H-Bindungen zwischen den komplementären Basen der beiden DNA-Stränge weitgehend gelockert werden. Die molare Absorption der DNA bei 260 m μ erreicht dann einen maximalen Wert. Diese Autoren konnten zeigen, daß der Quotient E_{260}/E_{280} eine konstante Größe darstellt, die charakteristisch für die molaren Verhältnisse der Basen ist. Es besteht eine nahezu lineare Beziehung zwischen dem molaren, prozentualen Anteil der Basen und diesem Quotienten. Auf dieser Basis bietet sich eine einfache und schnell durchzuführende Methode zur Bestimmung der Basenzusammensetzung einer DNA. Allerdings muß die DNA in reiner Form vorliegen und die Abwesenheit UV-absorbierender Substanzen wie RNA, Proteine und dergl. garantiert sein. Die bei der Denaturierung mit Essigsäure (pH 3) erfolgenden Veränderungen der DNA äußern sich u. a. in dem UV-Absorptionsspektrum. Wie in Abb. 48 zu sehen ist, werden die Absorptionsmaxima aller DNA-Präparate in den längerwelligen Spektralbereich verschoben, außerdem verringert sich die Differenz der Absorption im Maximum und im Minimum (vergl. die unbehandelte DNA).

Bei unseren Analysen berechneten wir den Quotienten E_{260}/E_{280} der DNA, die wir in 0,1 N Essigsäure lösten. Aus der von FREDERICQ et al (1961) aufgestellten Kurve wurde dann der prozentuale, molare Gehalt an Adenin bzw. Thymin abgelesen und hieraus der Guanin-Cytosin-Gehalt (G-C) berechnet. Die so erhaltenen Werte für den Prozentgehalt an G-C (Tabelle 8) stimmt gut mit den chromatographisch ermittelten überein.

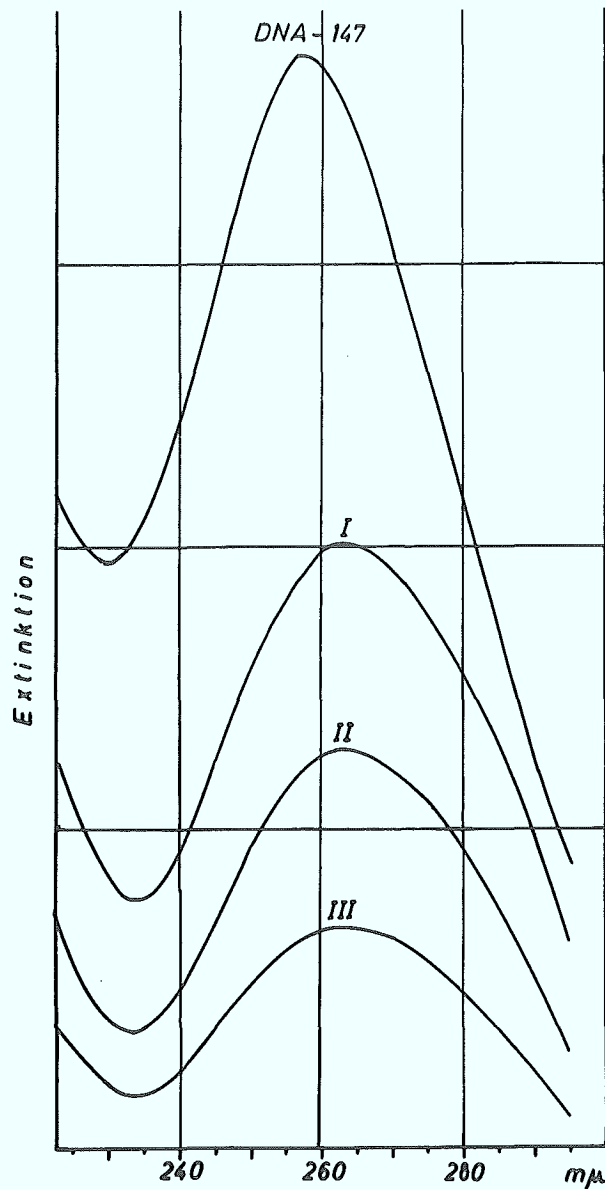


Abb. 48 UV-Absorptionsspektren von unbehauelter und denaturierter (Essigsäure, pH 3) DNA.
DNA-147 = DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147, gelöst in Standardpuffer (SSC); I = DNA-147 denaturiert; II = DNA-Cx denaturiert; III = DNA-C denaturiert. Für eine bessere Übersicht sind die Kurven auf der Ordinate gegeneinander verschoben. Man beachte die gleichsinnige Verschiebung der Spektren (I-III) der denaturierten DNA in den längerwelligen Bereich.

c) Thermische Denaturierung (T_m -Punkt) der DNA

Wie bereits bei der Charakterisierung unserer Donator-DNA (s. S. 26) ausgeführt wurde, besteht auch auf der Grundlage des hyperchromen Effektes (MARMUR und DOTY 1962) eine Möglichkeit zur Bestimmung der Basenverhältnisse. Der sog. T_m -Punkt gibt den molaren Anteil der Basenpaare Guanin-Cytosin am Aufbau der betreffenden DNA an (vergl. Abb. 8). MARMUR und DOTY (1962) konnten beweisen, daß die an zahlreichen DNA-Präparaten ermittelten T_m -Punkte in linearer Beziehung zum chemisch bestimmten G-C-Gehalt der jeweiligen DNA stehen. Die Autoren sicherten diese Funktion, indem sie zwei Lösungen mit unterschiedlicher Ionenkonzentration verglichen. In beiden Fällen entsprach einem um $0,41^{\circ}\text{C}$ höheren T_m -Punkt eine Zunahme des G-C-Gehaltes um 1 % (s. S. 26). Es wird angenommen, daß diese lineare Beziehung zwischen beiden Größen allgemein gültig ist, nur entsprechend der Ionenkonzentration des Lösungsmittels parallel verschoben wird.

Da der T_m -Punkt mit steigender Ionenkonzentration der Lösung ebenfalls höher liegt, entschieden wir uns mit Rücksicht auf die mechanischen Eigenschaften der Küvetten und um die Verdampfung des Lösungsmittels während der kontinuierlichen Messung (E260) gering zu halten (s. S. 26) für Lösungen mit geringer Ionenstärke (Tabelle 9). Nur in einigen Fällen arbeiteten wir auch mit Lösungen höherer Ionenkonzentration, führten dann aber die für die Bestimmung des T_m -Punktes notwendige Erhitzung der DNA durch die umständliche und materialaufwendige diskontinuierliche Methode durch.

Aliquote Teile (3 ml) der DNA-Lösung wurden in Ampullen abgefüllt und diese abgeschmolzen. Je Temperaturstufe verwendeten wir zwei Ampullen, inkubierten sie je 10 min im Ultrathermostaten und tauchten sie anschließend in ein Kältebad (Kohlensäureschnee + Äthanol). Anschließend auf Zimmertemperatur gebracht, wurden die Ampullen geöffnet und die Extinktion der einzelnen Lösungen (E260) gegen eine entsprechende Vergleichslösung gemessen. Mit dieser Methode konnten wir jedoch nur eine geringe Hyperchromizität der DNA feststellen (vergl. Tabelle 9).

Unsere Bestimmungen der Basenzusammensetzung (% an G-C) basieren auf der schon vorher beschriebenen T_m -Punkt-Ermittlung bei kontinuierlicher Erhitzung (s. S. 26). Der auf diese Weise bestimmte Gehalt an G-C in den einzelnen DNA-Präparaten (Tabelle 8) stimmt sehr gut mit den Ergebnissen überein, die wir durch Anwendung anderer Methoden erhielten. Die gute Reproduzierbarkeit der Bestimmung des T_m -Punktes und die hohe Empfindlichkeit dieser Methode können als Beweis für zwar geringe, aber doch reale Unterschiede in der Basenzusammensetzung der drei untersuchten DNA-Sorten angesehen werden. Daß die DNA des Stammes Cx eine Mittelstellung zwischen der DNA von St. 147 bzw. von St. C einnimmt, wird zusätzlich durch weitere Bestimmungen des T_m -Punktes gesichert (vergl. Tabelle 9). Diese Bestimmungen erfolgten zwar auf verschiedene Weise (s. oben), aber stets bei allen drei Präparaten unter gleichen Bedingungen. Da für diese Lösungen (Lösung b und c, s. Tabelle 9) keine experimentell gesicherte Bezugskurven der Relation zwischen T_m -Punkt und G-C-Gehalt bekannt sind und im Falle von Lösung a zwar der von MARMUR und DOTY (1962) benutzte Standardpuffer verwendet wurde, die Bestimmung des T_m -Punktes aber auf diskontinuierliche Weise (s. oben) durchgeführt wurde, konnten wir diesen T_m -Punkten nicht den entsprechenden G-C-Gehalt zuordnen. Nur Lösung d wurde für die Ermittlung des G-C-Gehaltes benutzt (Tabelle 8 und 9). Immerhin kann auch aus diesen T_m -Punkten auf tatsächliche Unterschiede in der Basenzusammensetzung der einzelnen DNA-Präparate geschlossen werden.

Tabelle 9. Thermische Denaturierung (T_m)

Pufferlösung	DNA-147 °C	DNA-Cz °C	DNA-C °C	Hyperchromizität (E_{260}) %
a) 0,15 M NaCl + 0,015 M Na-citrat	96,2 (2)	96,7 (2)	97,6 (2)	11,4
b) 0,015 M NaCl + 0,0015 M Na-citrat	81,7 (9)	82,3 (6)	83,0 (6)	14,3
c) 0,01 M PO_4 + 0,001 M Titriplex III	77,2 (2)	77,4 (3)	78,0 (3)	28,5
d) 0,0075 M PO_4 + 0,001 M Titriplex III	73,4 (4)	73,6 (3)	74,3 (5)	28,0

Die Bestimmung des T_m -Punktes erfolgte bei a) und b) durch diskontinuierliche Erhitzung der DNA-Lösung in Ampullen, bei c) und d) in temperierbaren Küvetten (siehe Methoden). In Klammern die Anzahl der Analysen.

Der Verlauf der Schmelzkurve entsprach stets dem in Abb. 8 wiedergegebenen. In der Literatur wird für intakte und biologisch aktive DNA eine Hyperchromizität von 30-45 % angegeben (STEINER und BEERS 1961). Im vorliegenden Falle haben die DNA-Präparate eine zwar gleiche, aber doch geringere Hyperchromizität. Diese ist besonders niedrig in Lösung a und b (s. Tabelle 9). Sie kann ihre Ursache in der benutzten diskontinuierlichen Methode (s. oben) haben. Ähnliche Feststellungen machen z. B. GANESAN und LEDERBERG (1964) an DNA aus *Bacillus subtilis*. Bei Anwendung der kontinuierlichen Methode erreicht diese DNA eine Hyperchromizität von 35 - 40 %. Dagegen ist in der plötzlich abgekühlten DNA-Lösung (diskontinuierliche Methode) nur noch eine von 15 % meßbar. Aus diesem Grunde kann nur die in Lösung c und d (Tabelle 9) nachgewiesene Hyperchromizität für einen Vergleich mit Angaben aus der Literatur herangezogen werden. Allerdings beziehen sich letztere meistens auf Messungen in Standard-

puffer (Lösung a in Tabelle 9). Die Höhe der Hyperchromizität ist jedoch auch abhängig vom Lösungsmittel. Wie FRONTALI, HILL et al. (1965) nachweisen, ist der hyperchrome Effekt um so geringer, je niedriger die Ionenstärke des verwendeten Lösungsmittels ist. Wir können daher im vorliegenden Falle annehmen, daß die Hyperchromizität unserer DNA-Präparate durchaus in gleicher Höhe liegt wie die der in der Literatur angegebenen.

Es sei noch erwähnt, daß - wie aus der Schmelzkurve (Abb. 8) hervorgeht - unsere DNA in jedem Falle in geordneter Molekülform vorliegt. Dies konnten wir durch die Reaktion mit Formaldehyd (s. S. 28) zeigen. Wir inkubierten die entsprechenden DNA-Lösungen (1 h, 37°C) in Gegenwart von Formaldehyd (1 %) und stellten nur eine Erhöhung der UV-Absorption (E_{260}) um maximal 1 % fest.

3. Untersuchungen an Apyrimidinsäuren

Geht man davon aus, daß Transformationen bislang nur zwischen nahe verwandten Bakterienarten nachgewiesen wurden und die Verwandtschaft wiederum einen ähnlichen Bau der betreffenden DNA impliziert (SUEOKA 1964), so überrascht die in den vorstehenden Untersuchungen nachgewiesene geringe Differenz in der Basenzusammensetzung der einzelnen DNA-Präparate nicht. Die von MARMUR, SCHILDKRAUT und DOTY (1962) und von SCHILDKRAUT et al. (1961) erhobene Minimalanforderung an die DNA von Partnern einer Transformation, nämlich eine sehr ähnliche Basenzusammensetzung der DNA von Donator und Acceptor, ist im vorliegenden Falle erfüllt (Tabelle 8). Wie aber leicht einzusehen ist, muß eine ähnliche Basenzusammensetzung nicht unbedingt Ausdruck verwandtschaftlicher Beziehungen sein. Tatsächlich wiesen CATLIN und CUNNINGHAM (1964) bei *Neisseria catarrhalis* nach, daß Transformationen auch zwischen Stämmen mit abweichenden Basenverhältnissen ihrer DNA möglich sind. Die Differenzen im Gehalt an Guanin-Cytosin betragen bis zu 3,5 %. Wesentlicher als die summarische Basenzusammensetzung dürften strukturelle Homologien im Aufbau der betreffenden DNA sein, die in der Sequenz der Purine und

Pyrimidine verankert sind.

Wir versuchten daher, durch Zuordnung von Unterschieden in der Basenfolge bzw. in der Häufigkeit von Basensequenzen bestimmter Länge die DNA unserer Bakterienstämme zu charakterisieren. Ein solches Vorhaben ist natürlich nur soweit realisierbar, als es die bislang entwickelten methodischen Möglichkeiten erlauben. Wir kennen mehrere Methoden, die Einblicke in die Verteilung von Pyrimidin-Nucleotiden unterschiedlicher Kettenlänge in der DNA geben. Hierbei wird die DNA durch eine milde Säurehydrolyse (z.B. SHAPIRO und CHARGAFF 1957 a, b, 1960; SPENCER und CHARGAFF 1961) oder durch Erwärmen mit Diphenylamin und Ameisensäure (BURTON und PETERSEN 1960; PETERSEN 1963) in Apurinsäure umgewandelt (TAMM, HODES und CHARGAFF 1952). Diese - ein Polynucleotid mit unversehrten Pyrimidingruppen (Cytosin, Thymin) - wird dann auf verschiedene Weise in ihre Pyrimidin-Nucleotide zerlegt und diese chromatographisch oder elektrophoretisch entsprechend ihrem Polymerisationsgrad fraktioniert. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Nucleotide in der DNA beruht auf dem Abbau zur Apyrimidinsäure (HABERMANN 1961, 1963 a, b 1964), die nur Purin-Nucleotide (Adenin, Guanin) enthält. Wir machten von dieser Möglichkeit Gebrauch und untersuchten die Häufigkeit von Purin-Nucleotiden am Aufbau der uns interessierenden DNA-Sorten.

Die DNA wird dabei mit Hydrazin behandelt und dadurch sämtliche Pyrimidingruppen der Nucleinsäure abgespalten. Die Polynucleotidkette der entstehenden Apyrimidinsäure enthält unversehrte Purinkomponenten. An den Stellen der ursprünglich vorhandenen Pyrimidingruppen sind nach HABERMANN (1963 a) Desoxyribose-Phosphat-Einheiten mit je einer freien Aldehydgruppe nachweisbar (s. Abb. 49). Durch basische Hydrolyse wird Apyrimidinsäure in Purin-Nucleotide unterschiedlichen Polymerisationsgrades zerlegt, die sich säulenchromatographisch je nach Kettenlänge fraktionieren lassen.

Bei der Durchführung unserer Untersuchungen an DNA-Präparaten von St. 147, St. Cx und von St. C folgten wir weitgehend den methodischen Angaben von HABERMANN (1961, 1963, a,b).

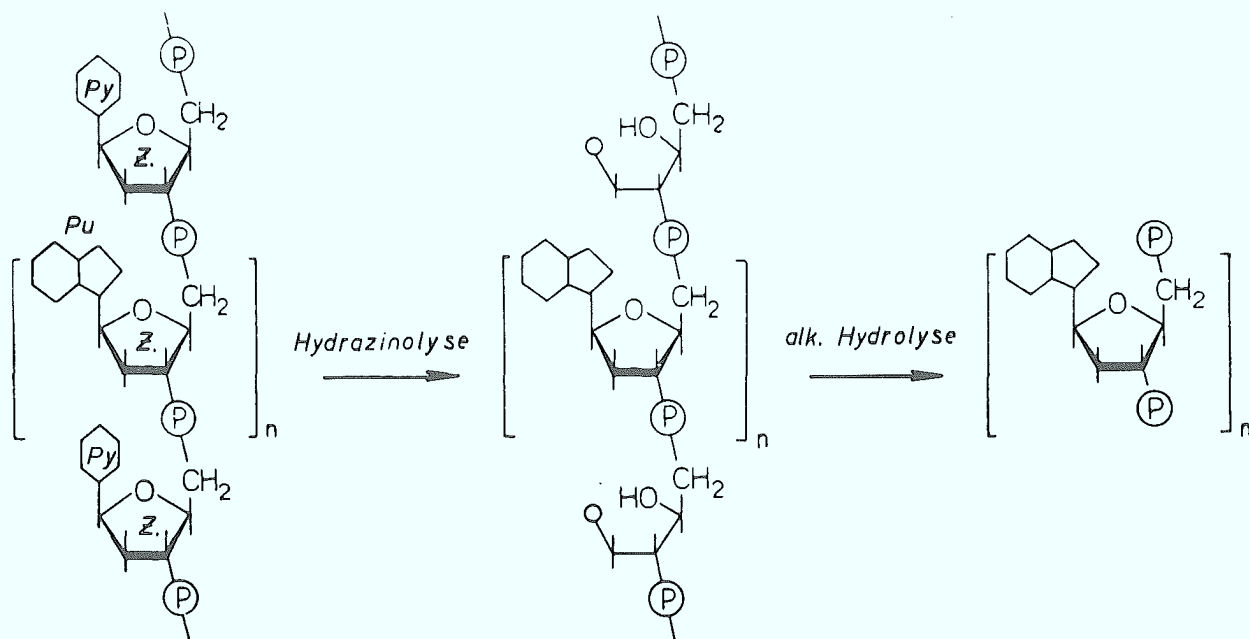


Abb. 49 Darstellung des DNA-Abbaues. 1. Stufe: durch Hydrazinolyse Umwandlung in Apyrimidinsäure, 2. Stufe: durch alkalische Hydrolyse Zerlegung in oligomere Purin-Nucleotide. Py = Pyrimidinbasen (Cytosin oder Thymin), Pu = Purinbasen (Adenin oder Guanin), Z = Desoxyribose, P = Phosphorsäure-esterbindungen. Schema nach HABERMANN (1963, S. 516).

20 mg trockene DNA wird in 1 ml wasserfreiem, frisch über NaOH destillierten Hydrazin gelöst und in abgeschmolzener Ampulle 3 h bei 60°C im Wasserbad erhitzt, dann das Hydrazin im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 3 ml 0,3 M KOH gelöst und in der wieder abgeschmolzenen Ampulle 1 h bei 100°C im Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlen wird der pH-Wert der Lösung mit Perchlorsäure auf 5,0 eingestellt, der $KClO_4$ -Niederschlag in der Kälte abzentrifugiert und der leicht gelbe Überstand mit 0,01 M Lithiumacetatpuffer (pH 5,0) auf 20 ml aufgefüllt. Die chromatographische Fraktionierung erfolgt an DEAE-Cellulose-Säulen (0,8 x 15 cm) mit einem linearen Gradienten von 0-0,4 M LiCl in 0,01 M Lithiumacetat (pH 5,0). Die Eluierung der Säule wird durch Waschen mit 1 M LiCl beendet (Abb.50). Es wurden 5 ml-Fractionen aufgefangen und gleichzeitig die UV-Absorption des Säuleneluates (254 m μ) automatisch registriert ("Uvicord", LKB Stockholm). Nach Vereinigung der zur betreffenden Fraktion gehörenden Gläser führten wir an den Fraktionen folgende Bestimmungen durch:

a) Die E₂₆₀-Absorptionseinheiten (E₂₆₀ bei Schichtdicke d = 1 cm x Volumen der betreffenden Fraktion) wurden berechnet und als Prozent der Summe aller Absorptionseinheiten ausgedrückt.

b) Die spektroskopische quantitative Bestimmung von Adenin und Guanin, bzw. der Summe beider und des Quotienten Guanin/Adenin basieren auf den Untersuchungen von KERR et al. (1949). Durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure wurden aliquote Teile der Fraktionen 1 N in bezug auf H₂SO₄ gemacht und in abgeschmolzenen Ampullen 2 h bei 100°C im Wasserbad hydrolysiert (vergl. Abb. 51). Die Berechnung des Gehaltes an Adenin bzw. Guanin erfolgte dann nach den von KERR et al. entwickelten Formeln (s. KERN 1931). Hierfür sind nur die Extinktionen der Lösungen bei den Wellenlängen 245 und 262 m μ notwendig. Eine Trennung beider Purine entfällt.

Die Basengehalte errechnen sich wie folgt:

$$\text{Adenin} = \frac{10,9 \times E_{262} - 7,58 \times E_{245}}{84 \times 10^9} \times \text{Volumen}$$

$$\text{Guanin} = \frac{13,5 \times E_{245} - 8,05 \times E_{262}}{84 \times 10^9} \times \text{Volumen}$$

Die Summe Adenin + Guanin jeder Fraktion bezogen wir prozentual auf die Gesamtsumme aller Fraktionen. Den Quotienten bildeten wir für jede Fraktion getrennt.

c) Außerdem bestimmten wir den Phosphorgehalt in den einzelnen Fraktionen nach der kolorimetrischen Methode von BERENBLUM und CHAIN (1938). Hierbei wurde in parallel laufenden Versuchen an aliquoten Teilen der Lösungen der anorganische - und nach vorangegangener Hydrolyse mit 70%iger HClO₄ (s. S. 20)-der Gesamtphosphor bestimmt. Die Differenz zwischen beiden nahmen wir als Maß für vorhandenen Nucleotid-Phosphor.

In der oben beschriebenen Weise untersuchten wir DNA-Präparate unserer drei Bakterienstämme. Außerdem bezogen wir DNA aus Lachsperma (California Corp. Los Angeles) zu Vergleichszwecken mit in unsere Versuche ein. In Abb. 50 wird ein typisches Eluierungsdiagramm von basisch hydrolysierter Apyrimidinsäure aus DNA-147 (A. tumefaciens-Stamm 147) wiedergegeben.

Die mit 1 bezeichnete Fraktion enthält nach HABERMANN (1963 a) UV-absorbierende Abbauprodukte sowie anorganischen Phosphor. Die von diesem Autor gefundene Fraktion 2 trat bei unseren Trennungen nur andeutungsweise auf; sie enthält nach Angaben des Autors Phosphor in Monoesterbindung. Die mit I - VI bezeichneten Fraktionen stellen Purin-Oligonucleotide vom Typ p(Pup)_n dar (p = Phosphorgruppe;

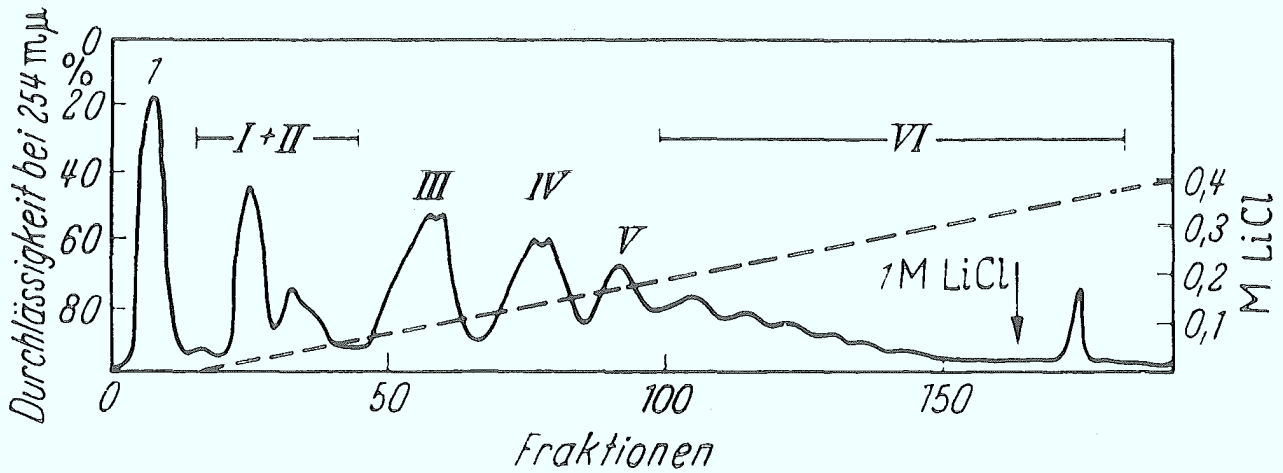


Abb. 50 Säulenchromatographische Fraktionierung basisch hydrolysierter Apyrimidinsäure von DNA-147 (*A. tumefaciens*) an einer DEAE-Cellulose-Säule. Linearer Salzgradient 0-0,4 M LiCl (vergl. methodische Angaben im Text).

Pu = Purine), mit je einer terminalen Phosphatmonoestergruppe an beiden Enden des Moleküls (s. Abb. 49). Die Fraktionierung an der DEAE-Cellulose-Säule erfolgt nach der Kettenlänge der Nucleotide. Fraktion I enthält demnach Nucleosid-diphosphate: pPup, Fraktion II Dinucleosid-triphosphate: pPupPup usw. Die UV-Absorptionsspektren der einzelnen Fraktionen (I-VI) gleichen sich und entsprechen der in Abb. 51 a gezeigten Kurve. Da Fraktion I und II nicht immer voneinander zu trennen waren, vereinigten wir beide und analysierten sie gemeinsam. In Fraktion VI sind Hexanucleotide mit denen längerer Kettenlänge (Waschen der Säule mit 1 M LiCl, s. Abb. 50) vereinigt.

Die Charakterisierung der Fraktionen bei den einzelnen DNA-Präparaten erfolgte, wie oben beschrieben wurde, durch die E_{260} -Absorptionseinheiten, durch den Gehalt an Purinen (Adenin + Guanin) und an Nucleotid-Phosphor. Die Werte bezogen wir prozentual auf

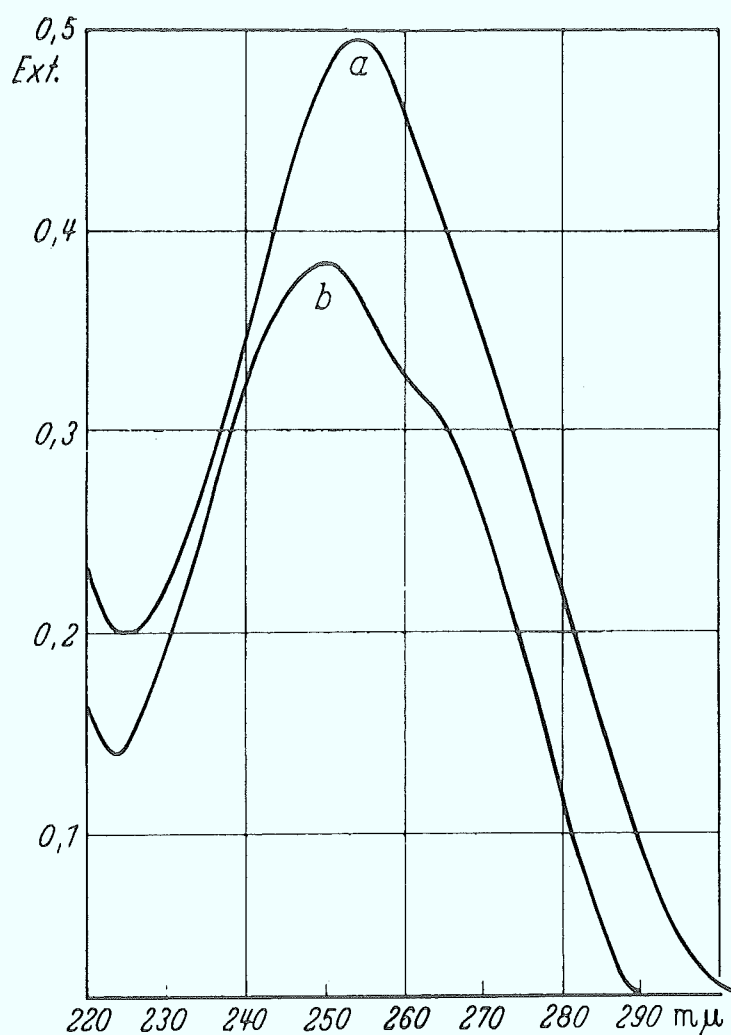


Abb. 51 UV-Absorptionskurven; a: von einer der säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen (hier Fraktion III vergl. Abb. 50); b: dieselbe Lösung nach Hydrolyse mit Schwefelsäure zur spektroskopischen Bestimmung von Adenin und Guanin. Das UV-Absorptionsspektrum setzt sich aus den Einzelabsorptionen beider Purine zusammen (Zweikomponenten-Gemisch). Die Kurven sind zur Verdeutlichung auf der Ordinate gegeneinander verschoben.

die Summe aller Fraktionen. Für jede Fraktion bildeten wir außerdem den Quotienten Guanin/Adenin.

Tabelle 10 Untersuchungen an Apyrimidinsäuren

a) Prozent- E_{260}					
Fraktionen	I · II	III	IV	V	VI
DNA-147 (5) ¹	20,0 ± 0,8 ²	23,2 ± 0,9	17,8 ± 0,5	11,6 ± 0,3	27,2 ± 1,8
DNA-Cx (3)	19,9 ± 0,3	23,7 ± 0,1	17,1 ± 0,6	11,4 ± 0,5	27,9 ± 1,9
DNA-C (3)	20,3 ± 0,2	23,7 ± 0,9	17,3 ± 0,5	11,5 ± 0,3	27,3 ± 1,9
Test-DNA ³ (2)	16,9 ± 0,1	18,0 ± 0,2	15,5 ± 0,5	11,7 ± 0,3	36,9 ± 2,2
b) Prozent-Guanin + Adenin					
DNA-147 (4)	19,6 ± 1,2	21,9 ± 1,8	17,3 ± 1,4	11,9 ± 1,3	30,8 ± 4,2
DNA-Cx (3)	19,2 ± 0,6	18,7 ± 4,3	17,1 ± 1,9	11,5 ± 1,2	33,6 ± 0,6
DNA-C (2)	18,6 ± 1,0	20,9 ± 0,2	15,0 ± 0,9	10,9 ± 0,3	34,5 ± 1,7
Test-DNA ³ (2)	15,9 ± 1,7	18,2 ± 0,1	14,8 ± 0,6	11,7 ± 0,7	39,5 ± 0,3
c) Guanin/Adenin					
DNA-147 (4)	2,93 ± 0,60	1,97 ± 0,34	1,43 ± 0,15	1,08 ± 0,20	1,45 ± 0,17
DNA-Cx (3)	3,49 ± 0,28	1,71 ± 0,36	1,57 ± 0,20	1,18 ± 0,13	1,83 ± 0,61
DNA-C (2)	3,76 ± 0,41	1,95 ± 0,12	1,40 ± 0,26	1,24 ± 0,09	1,29 ± 0,71
Test-DNA ³ (2)	1,75 ± 0,51	0,94 ± 0,01	0,81 ± 0,09	0,68 ± 0,13	1,02 ± 0,01
d) Prozent-Nucleotid-Phosphor					
DNA-147 (4)	29,8 ± 3,2	20,5 ± 2,1	12,5 ± 2,6	8,9 ± 1,2	28,6 ± 5,7
DNA-Cx (2)	28,0 ± 0,9	19,9 ± 3,0	13,7 ± 1,3	6,0 ± 0,9	32,3 ± 0,5
DNA-C (3)	32,5 ± 3,0	19,9 ± 0,6	12,6 ± 0,2	9,1 ± 0,6	25,7 ± 4,8

¹ Anzahl der Analysen. — ² Mittlere quadratische Abweichung. — ³ DNA aus Lachssperma.

In bezug auf die prozentuale Verteilung der E_{260} -Absorptionseinheiten sind die Apyrimidinsäuren der jeweiligen Bakterien-DNA einander gleich, unterscheiden sich aber deutlich von den Verhältnissen der in gleicher Weise untersuchten DNA aus Salmsperma ("Test-DNA"). Die Bestimmung des Gehaltes an Adenin und Guanin nach der oben beschriebenen spektroskopischen Methode (vergl. Abb. 51) ergab keine sicheren Unterschiede zwischen den drei Apyrimidinsäuren. Bei einer größeren mittleren Abweichung bewegen sich die Werte innerhalb der Fehlergrenze. Dasselbe gilt für den Quotienten Adenin/Guanin, der aus den Werten der spektroskopischen Messungen gebildet wurde (s.S. 104), und für die prozentuale Verteilung des Nucleotid-Phosphors, bei dessen Bestimmung wir allerdings nicht zwischen

Mono- und Diesterbindung (vergl. HABERMANN und MAIDLOVA 1963 b) differenzierten.

Somit lassen diese Untersuchungen zwischen den einzelnen Apyrimidinsäuren keine deutlich hervorstechenden Unterschiede in der Frequenz einzelner Nucleotide bestimmter Kettenlänge erkennen. Bei dieser Feststellung ist zu berücksichtigen, daß die hier angewandten Methoden nur die summarische Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen erfassen. Jede Fraktion stellt ein heterogenes Gemisch von Nucleotiden gleicher Kettenlänge, aber unterschiedlicher Basensequenz dar. Bereits Fraktion II (vergl. Abb. 50), die nach HABERMANN (1963 a) Dinucleosidtriphosphate vom Typ p (Pup)₂ enthält, würde die vier Nucleotide: pApAp pGpGp pGpAp pApGp enthalten. Mit wachsender Kettenlänge der Nucleotide steigt auch die Zahl der Varianten mit verschiedener Basenfolge. Wie leicht einzusehen ist, kann die Analyse der Apyrimidinsäuren, wie sie hier durchgeführt wurde, nur eine unbefriedigende Aussage über spezifische, strukturelle Unterschiede zwischen unseren DNA-Sorten machen. Wie wir gesehen haben, ist die Fraktionierung auch nur beschränkt möglich. Wir haben Hexanucleotide mit denen längerer Kettenlänge vereinigt und diese Mischung gemeinsam (Abb. 50) analysiert. Unterschiede, die möglicherweise bei höheren Polymerisationsgraden bestehen, werden demnach nicht aufgedeckt. Nur umfassende Detailuntersuchungen an den Einzelfraktionen könnten spezifische Unterschiede im Aufbau der betreffenden DNA-Präparate aufdecken. Der hierfür notwendige große Aufwand erscheint uns jedoch noch nicht gerechtfertigt, da die untersuchten DNA-Präparate zwar miteinander vergleichbar, aber doch - wie Fraktionierungen (Abb. 10, 45 und 46) zeigen - heterogen in ihrer Zusammensetzung sind.

4. Nachweis homologer Basensequenzen

Eine weitere Möglichkeit, strukturelle Unterschiede zwischen heterologer DNA nachzuweisen, besteht in der Renaturierung (Hybridisierung) entsprechender denaturierter DNA in der Einstrangform (MARMUR und LANE 1960; DOTY, MARMUR et al. 1960; MARMUR, SCHILDKRAUT

und DOTY 1962). Wird DNA thermisch denaturiert (s. S. 26) und dann längere Zeit Temperaturen von 60° ausgesetzt, entstehen durch Paarung von Teilen zweier DNA-Moleküle (einsträngig!) mit komplementärer Basenfolge Moleküle, die streckenweise doppelsträngig sind. Dabei treffen nicht etwa die beiden DNA-Stränge wieder zusammen, die durch die thermische Denaturierung voneinander getrennt wurden, sondern rein zufällig bilden mehr oder weniger große DNA-Stücke mit komplementärer Basensequenz Doppelstrangstrukturen (vergl. Abb. 52). Der Grad dieser Renaturierung oder Hybridisierung ist um so höher, je größer der Anteil homologer Basensequenzen in den miteinander reagierenden Molekülen bzw. Teilstücken ist.

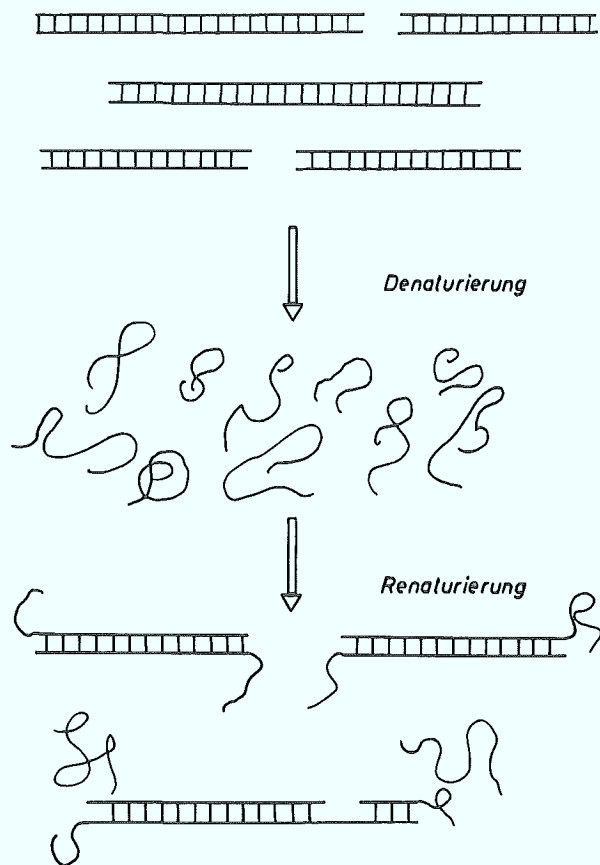


Abb. 52 Schematische Darstellung der Renaturierung thermisch denaturierter DNA (nach BRESCH 1954 S. 156).

Auf diesem Prinzip basiert die von McCARTHY und BOLTON (1963) entwickelte Methode, die relativ einfach durchzuführen ist und die

quantitative Erfassung homologer Basensequenzen zwischen DNA verschiedener Herkunft ermöglicht. Das Wesen dieser Methode sowie deren einzelne Arbeitsgänge kommen im folgenden Schema (Abb. 53) zum Ausdruck.

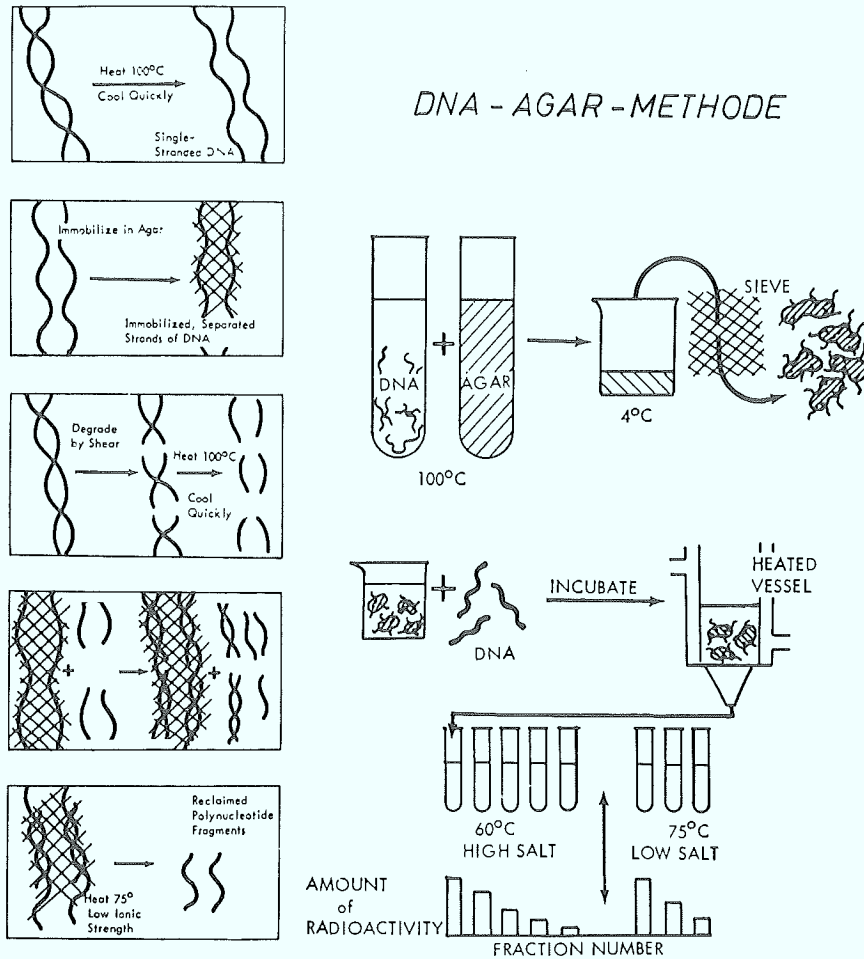


Abb. 53 Schematische Darstellung der DNA-Agar-Methode, links: das Prinzip dieser Methode; rechts: die einzelnen Arbeitsgänge (Schema nach HOYER, McCARTHY und BOLTON, 1964, S. 960).

Hierbei wird DNA thermisch denaturiert, schnell abgekühlt und in Agar eingebettet. Die mit dieser DNA zu vergleichende homologe oder heterologe DNA wird radioaktiv markiert, auf mechanischem Wege fragmentiert und diese DNA-Bruchstücke durch thermische Denaturierung in die Einstrangform überführt. Die radioaktiven, einsträngigen

Fragmente werden dann mit den im Agar eingebetteten ebenfalls einsträngigen DNA-Molekülen inkubiert. Vermöge ihrer geringen Größe (Molekulargewicht ca. $0,5 \times 10^6$) diffundieren sie in den Agar, wo dann eine Hybridisierung zwischen Molekülabschnitten mit homologer Basensequenz stattfindet. Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität gebundener, d.h. hybridisierter und nicht gebundener DNA ergibt die Hybridisierungsrate.

Wir gingen dabei in weitgehender Anlehnung an die Methode von McCARTHY und BOLTON (1963) folgendermaßen vor:

a) Herstellung von DNA-Agar. 300 mg Agar (Difco, "Spezial Agar-Noble") werden in 5 ml dest. Wasser bei 100°C gelöst und mit 5 ml einer Lösung von DNA (ca. 5 mg) in $0,1 \times \text{SSC}$ ($\text{SSC} = \text{"standard saline citrate"} = 0,15 \text{ M NaCl} + 0,015 \text{ M Na-citrat}$), die 5 min auf 100°C erhitzt worden ist, sofort gründlich gemischt (ca. 90°C) und diese Mischung in ein leeres auf Eis stehendes Becherglas gegossen. Das durch ein Sieb (200 mesh) passierte erstarrte Gel wird mit 500 ml $2 \times \text{SSC}$ (s. oben) in einem Standzylinder bei 60°C (Ultrathermostat) suspendiert, nach Absetzen des Sedimentes der Überstand mit den kleineren Agarpartikeln abgegossen, dieser Vorgang noch zwei- bis dreimal wiederholt und dann der DNA-Agar auf einer Fritte abgenutzt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes dieses Agars erfolgte nach Auflösen abgewogener Mengen DNA-Agar in 5 M NaClO_4 bei 60°C spektroskopisch. Wir benutzten dabei einen Umrechnungsfaktor von $0,022 \times E_{260}$ für 1μ denaturierte DNA/ml (Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$), der von SUEOKA und CHENG (1962) angegeben wird. Auf diese Weise stellten wir DNA-Agar von DNA-147, DNA-Cx und von DNA-C her und bewahrten ihn bis zur Verwendung im Kühlraum auf. Außerdem fertigten wir auch für Vergleichszwecke "Test-DNA-Agar" an und benutzten dabei DNA aus Lachssperma.

b) Die Gewinnung ^{32}P -markierter DNA-147 erfolgte aus einer Kultur von St. 147 in 1 l Mannit-Nährlösung (s. S. 33) in Gegenwart von 1 mC trägerfreiem ^{32}P (Buchler, Na-orthophosphat in isotonischer Lösung, pH 7) nach 60 h bei 28°C in der beschriebenen Weise (s. S. 17 ff.). Messungen im Methandurchflußzähler ergaben eine Impulsrate von etwa 500 Ipm/ μ DNA.

c) Die Fragmentierung der ^{32}P -DNA führten wir nicht wie McCARTHY und BOLTON (1963) mit einer French-Press, sondern mit Ultraschall durch. Je 4 ml ^{32}P -DNA-147 in $2 \times \text{SSC}$ (20μ -DNA/ml) wurden der Einwirkung eines Ultraschalldesintegrators (MSE, Modell 60 W; 20 kHz) bei maximaler Leistung des Gerätes (2-2,5 min.) und Kühlung der DNA-Lösung ausgesetzt. Anschließend erfolgte die thermische Denaturierung der beschallten DNA durch Erhitzen auf 100°C (5 min.) und schnelles Abkühlen in Eiswasser.

d) Für die Hybridisierungsansätze wurden ca. 0,5 g des betreffenden DNA-Agars in Röhrchen mit Schliffstopfen eingewogen, je 0,5 ml der beschallten und denaturierten ^{32}P -DNA-147 in 2 x SSC zugegeben und dann mindestens 16 h im Wasserbad bei 60°C (Ultrathermostat) gehalten. In den einzelnen Ansätzen wurden je 10 μ -markierte DNA in 0,5 ml mit DNA-Agar inkubiert, der 100 - 150 μ DNA je 0,5 g Agar enthielt. Nach Überführung dieser Proben in Chromatographieröhrchen (0,9 x 10 cm, mit Glasfilter), die von einem temperierbaren an einem Ultrathermostaten angeschlossenen Mantel aus Kupferblech umschlossen sind, erfolgte die Fraktionierung.

e) Fraktionierung. Die Säulen wurden 10 mal mit je 10 ml 2x SSC bei 60°C gewaschen und dabei die nicht spezifisch an die im Agar eingebettete DNA gebundene radioaktive DNA entfernt (Fraktion I). Dann folgten 5 Spülungen mit je 10 ml 0,01 x SSC bei 75°C, wodurch die mit der DNA im Agar hybridisierte markierte DNA ausgewaschen wird (Fraktion II).

f) Die Messungen der ^{32}P -Impulsraten wurden entweder in jedem einzelnen Glas der beiden Fraktionen (I und II) oder nach Vereinigung der entsprechenden Gläser durchgeführt. Zu diesem Zweck fügten wir zu je 10 ml der Lösungen 200 μ Träger-DNA (DNA aus Lachssperma) und fällten mit kalter Trichloressigsäure (TCE), in einer Endkonzentration von 0,6 M TCE, aus. Nach 30 min Aufbewahrung in Eiswasser, Filtration durch Millipore-Filter (Typ AAWP, Porenweite 0,8 μ , ϕ 25 mm) und Waschen mit kalter 0,3 M TCE wurden die feuchten Filter mit Hilfe eines Tropfens Methyl-Cellosolve (Merck) in den Aluminium-Meßschälchen fixiert und dann bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Die Impulsraten der einzelnen Proben wurden im Methan-durchflußzähler fensterlos gemessen. Unter % Hybridisierung verstehen wir den prozentualen Anteil der Radioaktivität von Fraktion II an der Gesamtaktivität beider Fraktionen.

In unseren Untersuchungen verwendeten wir nur ^{32}P -markierte DNA-147 und inkubierten sie mit DNA-Agar aus DNA-147, DNA-Cx und mit DNA-C. Die Hybridisierung von DNA-147 im Agar mit ^{32}P -DNA-147, d.h. die Renaturierung mit homologer DNA, setzten wir gleich 100 % und rechneten die "absolute" Hybridisierung der anderen DNA-Präparate (DNA-Agar) in "relative" Hybridisierung um (s. Tabelle 11). Abb. 54 gibt das Eluierungsdiagramm einer Säule wieder, bei der die homologe Hybridisierung: DNA-147 + ^{32}P -DNA-147 analysiert wurde.

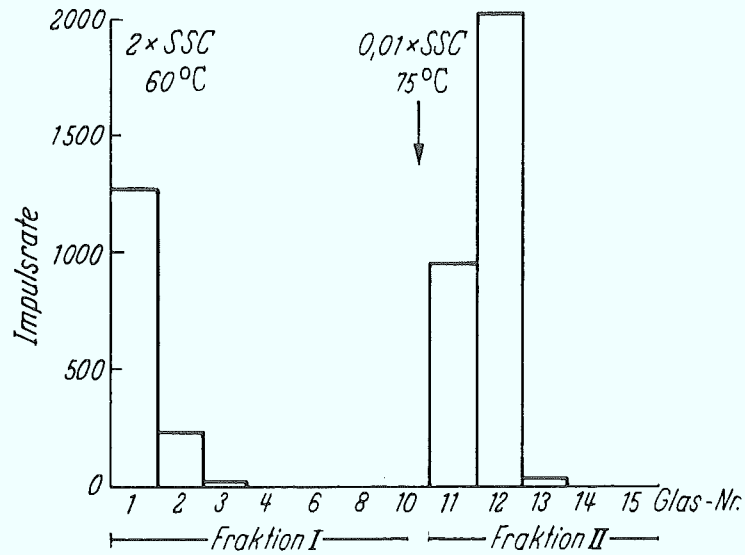


Abb. 54 DNA-Hybridisierung: Reaktion von DNA aus *A. tumefaciens* (St. 147) mit ^{32}P -markierter homologer DNA (Erklärung im Text). SSC = 0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat.

Tabelle 11 DNA-Hybridisierung

DNA-Agar	^{32}P -DNA	absolute Hybrid. %	relative Hybrid. %
St. 147 (9) ¹	St. 147	60,7 ± 4,7 ²	100
St. Cx (7)	St. 147	38,4 ± 4,1	63,2
St. C (7)	St. 147	18,3 ± 2,9	30,1
Test-DNA (2)	St. 147	2,0 ± 0,5	3,2

¹Anzahl der Analysen. - ²Mittlere quadratische Abweichung -
³DNA aus Lachssperma.

Zum Nachweis unspezifischer Hybridisierung untersuchten wir in gleicher Weise DNA aus Lachssperma ("Test-DNA"). Wie zu erwarten, war hierbei nur eine sehr geringe Hybridisierungsrate nachzuweisen. Wir können feststellen (vergl. Tabelle 11), daß sich die aus den drei Bakterienstämmen isolierten DNA-Präparate in bezug auf Hybridisierung mit DNA-147, der DNA aus dem genetischen Donator, spezifisch voneinander unterscheiden. Es ist interessant, daß St. Cx, der Transformant, im Anteil homologer Basensequenzen in seiner DNA eine Mittelstellung zwischen DNA-147 und DNA-C einnimmt.

Bei der Deutung dieser Feststellung müssen wir mehrere Punkte berücksichtigen. Das bei der Hybridisierung zufällige Zusammentreten von DNA-Bruchstücken mit mehr oder weniger großen Abschnitten homologer, d. h. komplementärer, Basensequenzen hat zur Folge, daß ungepaarte einsträngige Teile der DNA überhängen (vergl. Abb. 52; s. DOTY, MARMUR et al. 1960). Zum analytischen Nachweis hybrider DNA-Moleküle führen SCHILDKRAUT et al. (1961) und MARMUR et al. (1962) eine Zentrifugation im Dichtegradienten durch (analytische Ultrazentrifuge). Vorher werden die einsträngig gebliebenen Teile der DNA durch eine Phosphodiesterase abgebaut, die speziell einsträngige DNA angreift (LEHMAN 1960). Die Hybridisierung wird außerdem in Lösung durchgeführt. Bei der von uns angewandten DNA-Agar-Methode reagiert dagegen die im Agar eingebettete DNA mit Fragmenten der radiomarkierten DNA. Da die einsträngigen Teile der DNA nach der Renaturierung nicht abgebaut werden, erhebt sich die Frage, wieviele komplementäre Bindungen notwendig sind, um ein DNA-Fragment an die DNA im Agar zu binden. Außerdem dürfte die Größe der Fragmente ausschlaggebend sein. Aus diesen Gründen sind gleiche experimentelle Bedingungen Voraussetzung für die Bestimmung vergleichbarer Hybridisierungsraten. Wir haben bei unseren Untersuchungen stets alle drei DNA-Präparate gleichzeitig und in jedem Falle mit derselben ^{32}P -DNA angesetzt. Die in Tabelle 11 als "absolute" Hybridisierung angegebenen Werte sind daher miteinander vergleichbar. Wir haben so in der Hybridisierungsrate eine Aussage über den Anteil

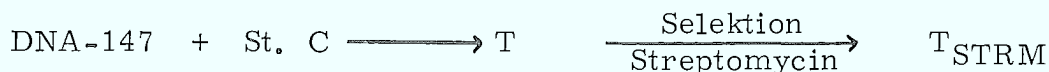
homologer Basenfolgen in der DNA der einzelnen Bakterienstämme, verglichen mit der DNA aus St. 147. Diese kann aber nur so verstanden werden, daß (vergl. Abb. 52) ein zufälliges Zusammentreten von Molekülabschnitten mit komplementären Basensequenzen erfolgt.

Fassen wir die vergleichenden Untersuchungen an den DNA-Präparaten aus den Partnern der uns interessierenden genetischen Transformation zusammen, so läßt sich folgendes sagen. Bei gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften sind geringe Unterschiede in der summarischen Basenzusammensetzung der einzelnen DNA-Sorten nachweisbar. Der Versuch, an partiellen Abbaustufen (Apyrimidinsäure) der betreffenden DNA Unterschiede in der Häufigkeit bestimmter Nucleotide mit verschiedener Kettenlänge herauszufinden, ergab jedoch keine spezifischen Unterschiede. Allerdings muß hier auf die methodisch bedingten Einschränkungen der angewandten Methode hingewiesen werden (s. S.108ff.). Bei Anwendung der DNA-Agar-Methode konnten wir dagegen zwischen den einzelnen DNA-Präparaten unterschiedliche Homologiegrade in bezug auf den Gehalt komplementärer Basensequenzen nachweisen. In dieser Beziehung nimmt die DNA des Transformanten St. Cx eine Mittelstellung zwischen der DNA des Donators und des Acceptors ein. Eine Feststellung, die wir auch bei den vergleichenden physiologisch-chemischen Untersuchungen machten. Wenn der Anteil homologer Basensequenzen in der DNA Ausdruck genetischer und damit auch taxonomischer Beziehungen zwischen den entsprechenden Mikroorganismen ist (MARMUR, SCHILDKRAUT und DOTY 1962; SUEOKA 1964), so beweist das in unserem Falle eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum*. Es liegt demnach eine interspezifische Transformation zwischen zwei taxonomisch nahestehenden Bakterienstämmen vor, die zur Entstehung des Stammes Cx geführt hat.

IV. Bestimmung der Transformationsrate

Wie bereits ausgeführt, kann man gewisse allgemein zutreffende Anforderungen an die Partner einer möglichen Transformation stellen. Transformationen sind nur zwischen verwandten Bakterien möglich. Diese Beziehung impliziert gleichzeitig einen ähnlichen strukturellen Aufbau der DNA der Transformationspartner. Daraus hat man den Schluß gezogen, daß die Häufigkeit von Transformationen, d. h. die sog. Transformationsrate, verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Acceptor und Donator widerspiegelt (SCHAEFFER 1964). Andererseits ist bekannt, daß die Aufnahmebereitschaft des Acceptors für die exogene DNA, die Kompetenz (S. 11 ff.), von sehr vielen Faktoren abhängt. Die optimale Kompetenz läßt sich nur empirisch ermitteln und gilt auch nur für den betreffenden Bakterienstamm. Da es keine Standardbedingungen für die genetische Transformation gibt, hat die Transformationsrate als Ausdruck für bestehende genetische Beziehungen zwischen Donator und Acceptor nur bedingten Wert. Zu diesen grundsätzlichen Schwierigkeiten tritt noch eine weitere hinzu. Es gibt noch keine quantitative Methode zur Selektionierung virulenter Transformanten. Wir haben bereits erwähnt, daß der von BERNAERTS und DE LEY (1963) vorgeschlagene biochemische Test (S. 69 ff.) zum Nachweis virulenter Agrobacterien nicht unseren Erwartungen entspricht. Dieser Test ist als Kriterium für die Virulenz bei *Agrobacterium tumefaciens* und somit auch als Selektionsmethode für virulente Transformanten nicht geeignet. Nach wie vor ist der biologische Nachweis der Virulenz, d. h. die experimentelle Induktion von Tumoren, die sicherste Methode (KERN 1966). Da aber, wie noch zu zeigen ist, in unserem Falle die Transformationsrate ohnehin sehr niedrig ist, verzichteten wir vorerst auf die Bestimmung der Transformationsrate in bezug auf die Virulenz entstehender Transformanten.

Eine andere Möglichkeit, die bei unseren Versuchsbedingungen auftretenden Transformanten quantitativ zu erfassen, liegt in der Selektion z. B. streptomycinresistenter Transformanten. Donator und Acceptor unterscheiden sich in diesem Merkmal (s. Tabelle 4, S. 76). Der Versuchsansatz läßt sich folgendermaßen formulieren:



Die Versuche hierzu wurden in der folgenden Weise durchgeführt (vergl. S. 33): 20 h alte Kulturen von Stamm C werden mit "Pisum-Nährlösung" auf einen Titer von 10^8 Bakterien/ml gebracht, abzentrifugiert, in anorganischer Lösung (MEA-TE-Lösung nach SCHWINGHAMER 1960) suspendiert und diese Suspension auf drei Röhrchen (je 3 ml) aufgeteilt.

Röhrchen 1: Zusatz von 1 ml steriler DNA; die Endkonzentration an DNA im Ansatz beträgt $200 \mu\text{g/ml}$.

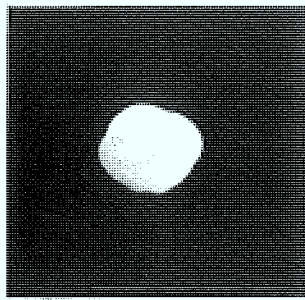
Röhrchen 2: Zusatz von 1 ml DNA-Lösung nach vorangegangener Inkubation mit DNase (2 h, 37°C) = Inaktivierungstest (s. S. 33).

Röhrchen 3: Zusatz von 1 ml "Pisum-Nährlösung" = Kontrolle.

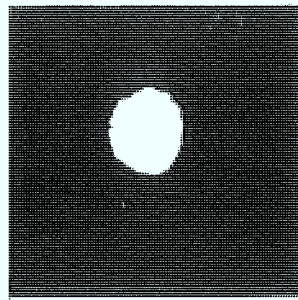
Nach vierstündiger Bebrütung werden die einzelnen Ansätze auf Streptomycinagar ($100\% \text{STRM/ml}$) ausgeplattet. Die Auszählung streptomycinresistenter Transformanten erfolgte nach 3-4 Tagen. Die Ansätze in Röhrchen 2 und 3 dienten zur Prüfung der Sterilität der DNA, bzw. deren Inaktivierung durch DNase und auch zum Nachweis spontan auftretender Mutanten. Aliquote Volumina aus Röhrchen 3 wurden auch auf Nährboden ohne Streptomycin ausgeplattet und damit die 100%-Stufe als Bezug für die Transformationsrate festgelegt.

Wir erhielten auf diese Weise eine Transformationsrate in der Größenordnung von $4-7 \times 10^{-6}$ streptomycinresistenter Transformanten. Diese Angabe stellt einen Mittelwert von 10 verschiedenen Ansätzen dar. In Abb. 55 werden die Kolonieförmungen des Donators und des Acceptors mit denen einiger Transformanten verglichen. Letztere sind z.T. glatt und durchscheinend oder haben einen fein gezähnten Kolonierand und zeigen eine leicht runzelige Oberflächenstruktur.

Bei Reinkulturen streptomycinresistenter Transformanten auf normalem "Pisum-Agar" stellten wir fest, daß einige von ihnen streptomycinabhängig sind, d.h. nur in Gegenwart von Streptomycin wachsen können. Wir prüften insgesamt 22 willkürlich isolierte Transformantenstämme auf Streptomycinabhängigkeit, indem wir die Konzentration des Antibiotikums ermittelten, bei der diese ein deutliches Wachstum zeigten. Die Tests führten wir in Flüssigkeitskulturen durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.



Donator



Acceptor

Transformanten

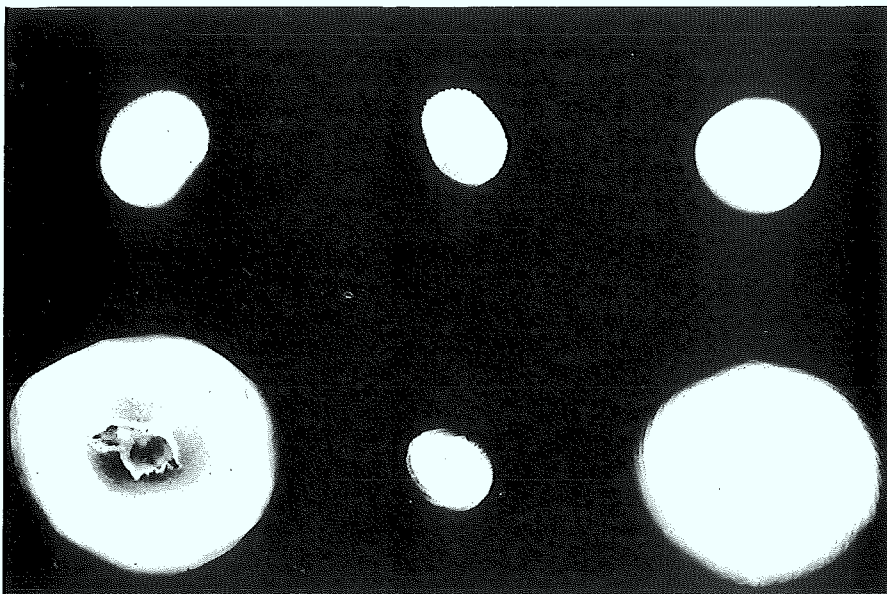


Abb. 55 Koloniefornien des Donators: *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147; des Acceptors: *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C und einiger Transformanten mit dem Selektionsmerkmal: Streptomycinresistenz. Bei den beiden großen Kolonien (untere Reihe links und rechts) handelt es sich um streptomycinabhängige Transformanten.

Mit diesem Befund können wir Resultate von BALASSA und GABOR (1965) bestätigen. In ihren Untersuchungen an *Rhizobium lupini* stellen diese Autoren fest, daß sowohl die Streptomycinresistenz als auch die -abhängigkeit gemeinsam oder getrennt durch dasselbe DNA-Präparat

übertragen werden können. Sie nehmen an, daß beide Eigenschaften in einem Genkomplex lokalisiert sind. Inwieweit allerdings eine stabile oder instabile Streptomycinabhängigkeit vorliegt, wurde von uns nicht untersucht.

Tabelle 12 Streptomycinresistenz und -abhängigkeit

Streptomycinresistente Transformanten (100 μ /ml), Anzahl der isolierten Stämme mit gleichem Verhalten	Streptomycinkonzentrationen (μ /ml)					
	0	20	40	60	80	100
12	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+

Tabelle 13 Agglutinationstest

Transformanten mit gleichem serologischen Verhalten	Antiserum-St. 147	Antiserum-St. C
34	-	+
1	+	-
4	+	+
1	-	-

Ferner prüften wir insgesamt 40 aus den Transformationsansätzen isolierte Stämme auf ihr serologisches Verhalten gegenüber Antiseren des Donators bzw. Acceptors im Agglutinationstest auf Objektträgern (s. S. 77 ff.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Die überwiegende Zahl der Transformanten weist serologische Beziehungen zum Acceptor und nur vereinzelt zum Donator oder zu beiden Transformationspartnern auf. Nur in einem Falle fanden wir einen serologisch selbständigen Typ. Bei diesen Resultaten muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Auswahl der Transformanten willkürlich war und daher keine quantitative Aussage über das Vorkommen der entsprechenden serologischen Typen möglich ist.

Die Virulenz streptomycinresistenter bzw. -abhängiger Transformanten bezüglich der Induktion pflanzlicher Tumoren wird z. Zt. geprüft. Dabei erhebt sich die Frage, ob die Streptomycinresistenz ein geeigneter "Marker" für die Virulenz ist (vergl. S. 74).

Wir haben uns bisher nur mit der Transformation *Agrobacterium* \longrightarrow *Rhizobium* beschäftigt und konnten beweisen, daß sie tatsächlich erfolgt. Uns interessierte aber auch die Frage, ob eine Transformation in umgekehrter Richtung: *Rhizobium* \longrightarrow *Agrobacterium* ebenfalls nachweisbar ist. Nach Tabelle 4 (s. 76) eignet sich als Selektionsmerkmal das Sulfonamid Marbadal, ein 4-Aminobenzolsulfthiocarbamidsalz des 2-Aminomethylbenzolsulfonamids. Die Versuchsanstellung läßt sich formulieren:



Die Transformationsansätze erfolgten wie oben dargestellt. Wir benutzten Marbadalagar (600 μ g Marbadal/ml) zur Selektion und ermittelten eine Transformationsrate von $13-16 \times 10^{-6}$ marbadalresistenter Transformanten bei drei verschiedenen Ansätzen. Von 15 isolierten Transformantenstämmen reagierten im Agglutinationstest 13 positiv mit dem Antiserum des Acceptors (St. 147), zwei zeigten nur eine schwache Reaktion. In keinem dieser Fälle konnten wir eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Antiserum des Donators (St. C) beobachten.

Somit beweisen die hier beschriebenen quantitativen Transformationsversuche, daß *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147 und *Rhizobium leguminosarum*-Stamm gegenseitig transformierbar sind. Die ermittelten Transformationsraten liegen in ähnlicher Größenordnung und sind vergleichbar mit denen, die von anderen Autoren bei interspezifischen Transformationen festgestellt wurden (z.B. ZELAZNA 1963).

V. DNA-Hybridisierung als Methode zum Nachweis genetischer und taxonomischer Beziehungen

Auf grund vergleichender Untersuchungen an der DNA aus den Partnern der Transformation konnten wir nachweisen, daß zwischen der DNA des Donators (*A. tumefaciens*-Stamm 147) und des Acceptors (*Rh. leguminosarum*-Stamm C) ein gewisser struktureller Homologiegrad besteht. Der Transformant (Stamm Cx) nimmt in dieser Beziehung eine Mittelstellung ein. Entsprechend den heute vertretenen Vorstellungen (MARMUR, SCHILDKRAUT und DOTY 1962; SUEOKA 1964) deuteten wir den Anteil homologer Basensequenzen als Ausdruck enger genetischer und taxonomischer Relationen zwischen Donator, Transformant und Acceptor. Wenn Transformationen nur zwischen verwandten Bakterien möglich sind, wäre zu fordern, daß durch den Nachweis komplementärer Basenfolgen in der DNA prospektiver Transformationspartner eine gewisse Wahrscheinlichkeit für die gegenseitige Transformierbarkeit erbracht werden könnte. Zumindestens aber wäre die Möglichkeit gegeben, verwandtschaftliche Verhältnisse zwischen den jeweiligen Bakterien aufzudecken.

Wie eingangs erwähnt wurde (s. S. 1), sind für die taxonomische Eingliederung der Rhizobien im wesentlichen die Fähigkeit zur Knöllchenbildung und die Wirtsspezifität maßgebend (vergl. BERGEY 1957). Die Systematik der Rhizobien ist immer noch ein viel diskutiertes Problem (GRAHAM 1964). Schon aus diesem Grunde wären weiterführende Wege wünschenswert. Deshalb ist für unsere Betrachtungen der Versuch von WAGENBRETH (1961) sehr interessant, durch die Be-

stimmung des relativen Basengehaltes der DNA verschiedener Rhizobium-Stämme die systematische Einordnung der Knöllchenbakterien zu sichern. Der genannte Autor konnte zeigen, daß die Rhizobien entsprechend der Basenzusammensetzung ihrer DNA eine einheitliche Gattung bilden. WAGENBRETH konnte auf dieser Basis zwei Gruppen unterscheiden, die mit den "schnell wachsenden" und den "langsam wachsenden" Rhizobien identisch sind. DE LEY und RASSEL (1965) finden eine Korrelation zwischen der Basenzusammensetzung von DNA aus 35 Stämmen der Gattung Rhizobium und ihrem Begeißelungstyp. Nach Ansicht von SUEOKA (1964) haben verwandte Organismen auch einen ähnlichen G-C-Gehalt in ihrer DNA. Differiert dieser bei zwei Bakterienarten um mehr als 10 %, dann ist es wenig wahrscheinlich, daß diese beiden Bakterien DNA-Moleküle mit übereinstimmender Basenzusammensetzung besitzen (SUEOKA, MARMUR und DOTY 1959). Jedoch schließen gleiche Basenverhältnisse nicht aus, daß Unterschiede in der Basensequenz vorliegen.

Wir sehen daher in der beschriebenen DNA-Hybridisierungsmethode (s. S. 108 ff.) einen weiterführenden Weg zum Nachweis genetischer und taxonomischer Beziehungen zwischen den betreffenden Bakterien. Zur Klärung der Frage, welche Rhizobium-Arten bzw. -Stämme als mögliche Transformationspartner von *Agrobacterium tumefaciens* in Frage kommen könnten und wieweit taxonomische Aussagen möglich sind, führten wir entsprechende DNA-Hybridisierungsversuche durch. An dieser Stelle kann allerdings nur über vorläufige Ergebnisse berichtet werden, die mit der gebotenen Vorsicht aufzunehmen sind.

Wir isolierten aus verschiedenen Stämmen von *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter* und der Gattung Rhizobium die DNA, deren Gehalt an Guanin-Cytosin durch thermische Denaturierung (T_m -Punkt, S. 98) bestimmt wurde.

Besonders bei DNA-Präparaten aus einigen Rhizobium-Stämmen konnten wir nur eine geringe Hyperchromizität feststellen. In der Annahme, daß die DNA in denaturierter Form vorliege, haben wir den Präparationsgang mehrfach variiert; u. a. wendeten wir auch die Methode

von BERNIS und THOMAS jr. (1965) an, die die Gewinnung hochmolekularer DNA ermöglicht (vergl. S. 30). Aber auch diese DNA-Präparate wiesen nur eine geringe Hyperchromizität von ca. 15% auf (vergl. Abb. 8 und Abb. 56). Da es sich bei diesen Rhizobien um starke Schleimbildner handelt, lag die Vermutung nahe, daß Verunreinigungen der DNA-Präparate mit Polysacchariden des Schleimes hierfür verantwortlich sein könnten. Durch elektrophoretische Fraktionierung solcher DNA-Präparate konnten wir den Beweis für diese Annahme führen (S. 22 ff.).

In Abb. 56 werden die thermischen Denaturierungskurven eines solchen DNA-Präparates vor und nach der elektrophoretischen Reinigung gegenübergestellt. Hieraus geht hervor, daß die Depression der Hyperchromizität eindeutig durch die Polysaccharide bedingt ist. Andererseits sieht man aber auch (Abb. 56), daß die Lage des T_m -Punktes kaum verschoben ist. Demnach ist trotz dieser Verunreinigung die Bestimmung des G-C-Gehaltes der DNA durch den T_m -Punkt möglich. Da wir von dieser Möglichkeit zur Reinigung der DNA nur in einigen Fällen Gebrauch machen konnten, sei auf diese Schwierigkeiten aufmerksam gemacht. Wir verwendeten für die Hybridisierungsversuche nur DNA-Präparate, die sich hinsichtlich der thermischen Denaturierung normal verhielten (vergl. Abb. 8).

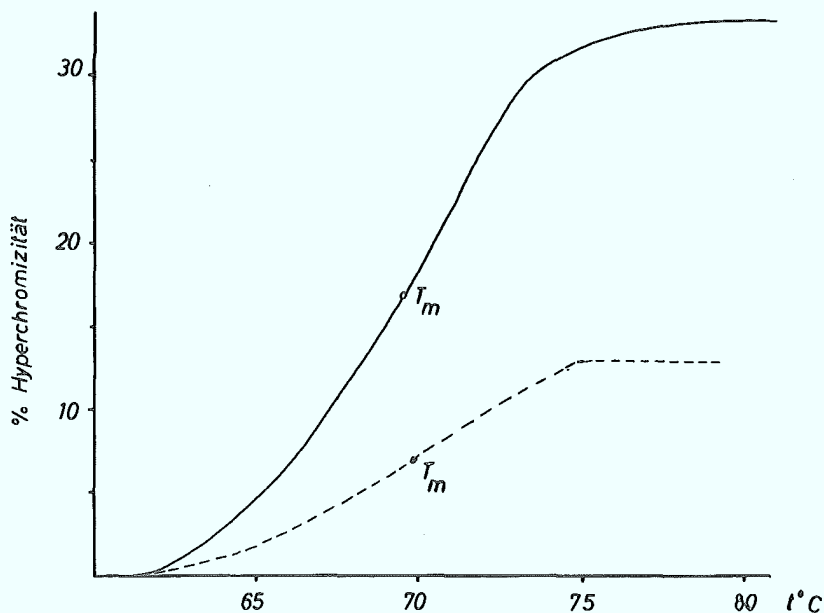


Abb. 56 Thermische Denaturierungskurven von DNA aus einem Stamm von *Rhizobium japonicum*. ---- = ohne weitere Reinigung, — = dasselbe Präparat nach Fraktionierung durch Ablenkungselektrophorese (vergl. Abb. 4 und 5). Man beachte die gleiche Lage des T_m -Punktes.

Die Hybridisierungsversuche führten wir in der auf S. 108 beschriebenen Weise durch, indem wir ^{32}P -markierte DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 mit entsprechendem DNA-Agar inkubierten und die Hybridisierungsrate ermittelten. Die ersten vorläufigen Ergebnisse dieser Analysen werden in Abb. 57 dargestellt. Diese Versuche bedürfen erneuter Überprüfung und müssen durch Einbeziehung von DNA-Präparaten weiterer Bakterienstämme gesichert werden.

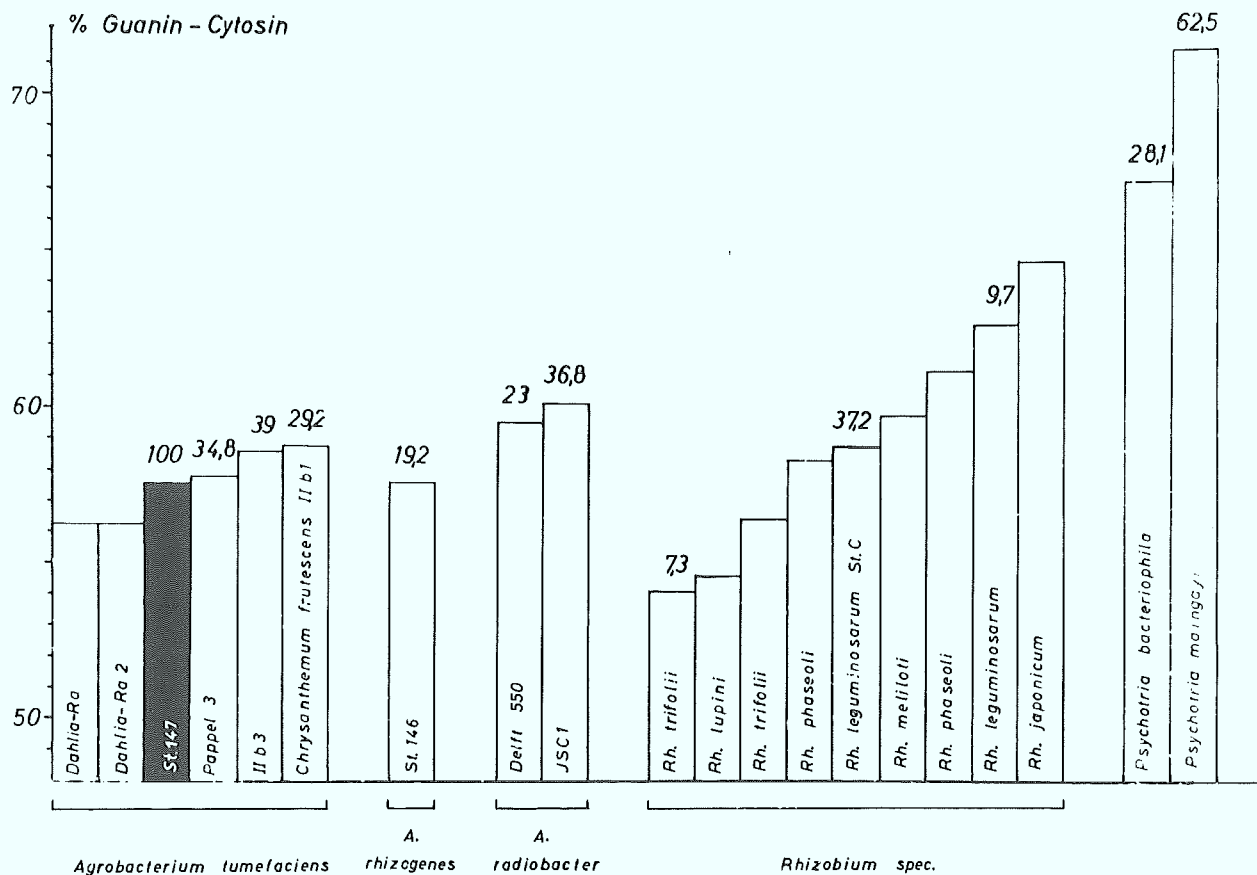


Abb. 57 Der relative Basengehalt in der DNA verschiedener Stämme der Rhizobiaceae, ausgedrückt durch den prozentualen Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaaren; Bestimmung durch den T_m -Punkt und außerdem z. T. papierchromatographisch an DNA-Hydrolysaten (s. S. 94). Die DNA-Hybridisierung erfolgte nach der Methode von McCARTY und BOLTON (1963) mit ^{32}P -markierter DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 (schwarze Säule). Die relativen Hybridisierungsraten wurden prozentual auf die als 100 % gesetzte homologe Rate (DNA-147 + DNA-147; 60 % "absolute" Rate, vergl. Tabelle 11) bezogen. Die Zahlenangaben auf den einzelnen Säulen stellen die relativen Hybridisierungsraten dar. Sie sind Mittelwerte von je drei Ansätzen, die Abweichungen entsprechen denen in Tabelle 11.

Immerhin zeichnet sich, wie aus Abb. 57 deutlich zu erkennen ist, bereits jetzt eine enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen *A. tumefaciens* und *A. radiobacter* ab. Die Hybridisierungsraten dieser beiden Arten liegen in ähnlicher Größenordnung. Der untersuchte Stamm 146 von *A. rhizogenes* dagegen weist eine geringere Hybridisierungsrate auf. Es ist überraschend, daß *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C (s. Abb. 57) eine gleich hohe Hybridisierungsrate hat wie die geprüften Stämme von *A. tumefaciens* (Pappel 3; II b 3) und *A. radiobacter* (ISC 1) hat. Eigentlich wäre anzunehmen, daß die Rate innerhalb der Art *A. tumefaciens* wesentlich höher liegen müßte. Wieweit *Rh. leguminosarum* in dieser Beziehung einen Sonderfall innerhalb der Gattung *Rhizobium* darstellt, kann z. Zt. noch nicht entschieden werden.

Was wir aber an diesen ersten Ergebnissen schon jetzt demonstrieren können, ist die beschränkte Aussagekraft der summarischen Basenzusammensetzung der DNA (G-C), wenn sie als einziges Kriterium für die taxonomische Stellung des betreffenden Bakteriums herangezogen wird. Es soll nicht bestritten werden, daß verwandte Organismen eine ähnliche Zusammensetzung ihrer DNA haben. Hier sei auf die Darstellungen von SUEOKA (1964) verwiesen. In der von uns angewandten DNA-Hybridisierungsmethode (McCARTHY und BOLTON 1963) sehen wir aber einen weiterführenden analytischen Weg, der weiterreichende Schlüsse erlaubt als nur der relative Basengehalt der DNA.

Abschließend seien einige weitere Ergebnisse mitgeteilt, die sich bei Anwendung der Hybridisierungsmethode ergeben haben. Wir verfolgen bei unseren Untersuchungen nicht nur die Absicht, neue potentielle Transformationspartner für *A. tumefaciens* zu finden, sondern sind auch an Fragen interessiert, die mit der symbiontischen Stickstoffassimilation der Knöllchenbakterien zusammenhängen. Wir bezogen daher auch Blatt symbionten mit in unsere Untersuchungen ein. Die Bakterien, die in den Blättern verschiedener *Rubiaceae* leben und Stickstoff binden (CENTIFANTO und SILVER 1964), verdienen besondere Beachtung (SCHAEDE 1962; SCHWARTZ 1959). Mehrere Arten der Gattungen *Psychotria* und *Pavetta* bilden in ihren Blättern Knötchen, die dicht mit Bakterien besiedelt sind.

Diese Art des Zusammenlebens von Pflanze und Bakterium soll hier nicht näher erörtert werden. Jedoch sei darauf hingewiesen, daß diese Bakterien einen morphogenetischen Einfluß auf die Wirtspflanzen ausüben, da bakterienfreie Pflanzen verkümmern (FABER 1912). Es liegt hier eine zyklische Symbiose vor, bei der die Bakterien vom Sproßscheitel in die Blütenanlagen, von dort in die Samenanlagen und in den Samen gelangen. Sie infizieren schizogene Sekretbehälter der Blattanlagen und verursachen die Entstehung von Blattknötchen, in denen sie interzellulär vorkommen (s. Abb. 58-61).

Die systematische Eingliederung der aus Blattknötchen der Rubiaceae isolierten Bakterien hat zu sehr unterschiedlichen Auffassungen geführt. FABER (1912) schlug die Bezeichnung Mycobacterium rubiacearum vor, während ADJANOHOON (1957) Blattsymbionten von Psychotria-Arten in die Gattung Flavobacterium stellt. Neuerdings klassifizieren CENTIFANTO und SILVER (1964) Endophyten aus Psychotria bacteriophila auf grund morphologischer, serologischer und physiologischer Charakteristika als Klebsiella rubiacearum, stellen sie also in die Klebsiella-Aerobacter-Gruppe der Enterobacteriaceae (s. BERGEY, 1957). KNÖSEL (1963) sieht dagegen in morphologischen und kulturellen Merkmalen, insbesondere in dem Vermögen zur Sternbildung (s. Abb. 33), einen Hinweis auf die Zugehörigkeit der Blattbakterien zum Verwandtschaftskreis der Rhizobiaceae. Er schlägt für die Blattknöllchenbakterien - besonders bei Pavetta zimmermanniana - den Namen Phyllobacterium rubiacearum vor. In die neue Gattung Phyllobacterium ordnet dieser Autor u.a. auch die in Blättern von Ardisia vorkommenden Bakterien - Bacterium foliicola, MIEHE 1911 - ein.

Da unseres Wissens noch keine Angaben über die Zusammensetzung der DNA aus Blattbakterien vorliegen und daher auch noch keine Hybridisierungsanalysen durchgeführt sind, isolierten wir aus Blattknöllchen von Psychotria bacteriophila (Abb. 58) und Ps. maingayi einige Bakterienstämme und kultivierten sie auf Mannitagar (Methoden S. 34). Von je einem Stamm legten wir Massenkulturen in flüssigem Mannit-Medium an und isolierten aus ihnen DNA. Bei der thermischen Denaturierung und Bestimmung des

T_m -Punktes hatten diese DNA-Präparate eine Hyperchromizität von 27-30%. Aus den T_m -Punkten ergab sich in beiden Fällen ein hoher Gehalt an Guanin-Cytosin, 67% bei *Psychotria bacteriophila* und 71,3% bei dem aus Blättern von *Ps. maingayi* isolierten Bakterienstamm. Bei Hybridisierungsversuchen mit radioaktiv markierter DNA aus *A. tumefaciens*-Stamm 147 (s. Abb. 57) stellten wir eine überraschend hohe Hybridisierungsrate zwischen beiden fest. Im Falle des einen Bakterienstammes aus *Psychotria bacteriophila* liegt diese mit 28% in ähnlicher Größenordnung wie z. B. bei Vertretern der Gattung *A. tumefaciens* oder *A. radiobacter*. Bei dem aus *Psychotria maingayi* isolierten Stamm wiesen wir sogar eine Hybridisierungsrate von 62% nach.

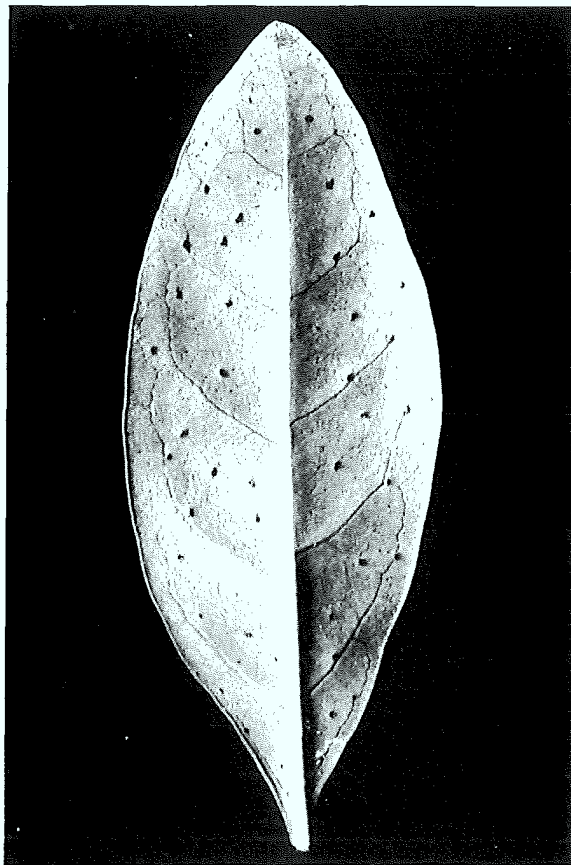


Abb. 58 Blattunterseite von *Psychotria bacteriophila* mit bakteriengefüllten Pusteln.

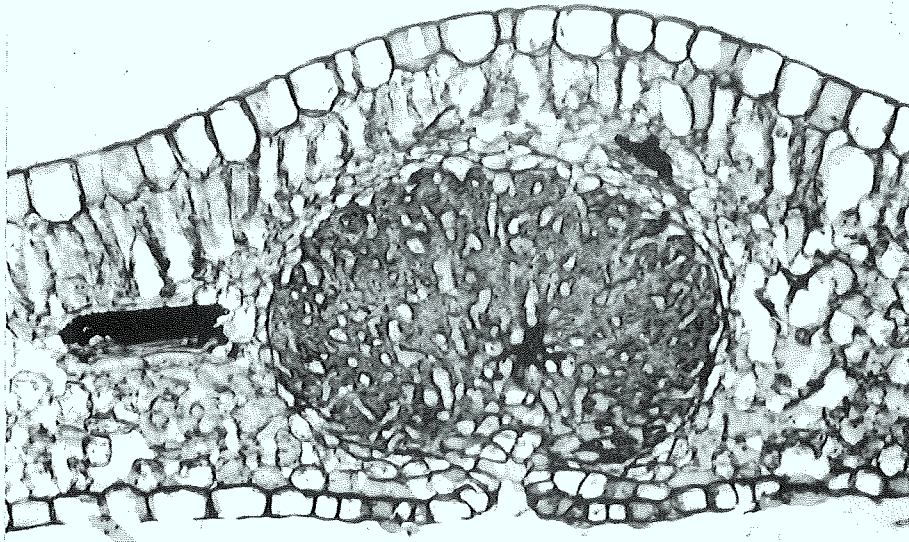


Abb. 59 *Psychotria bacteriophila*. Querschnitt durch ein Blattknötchen. Vergrößerung ca. 40 x

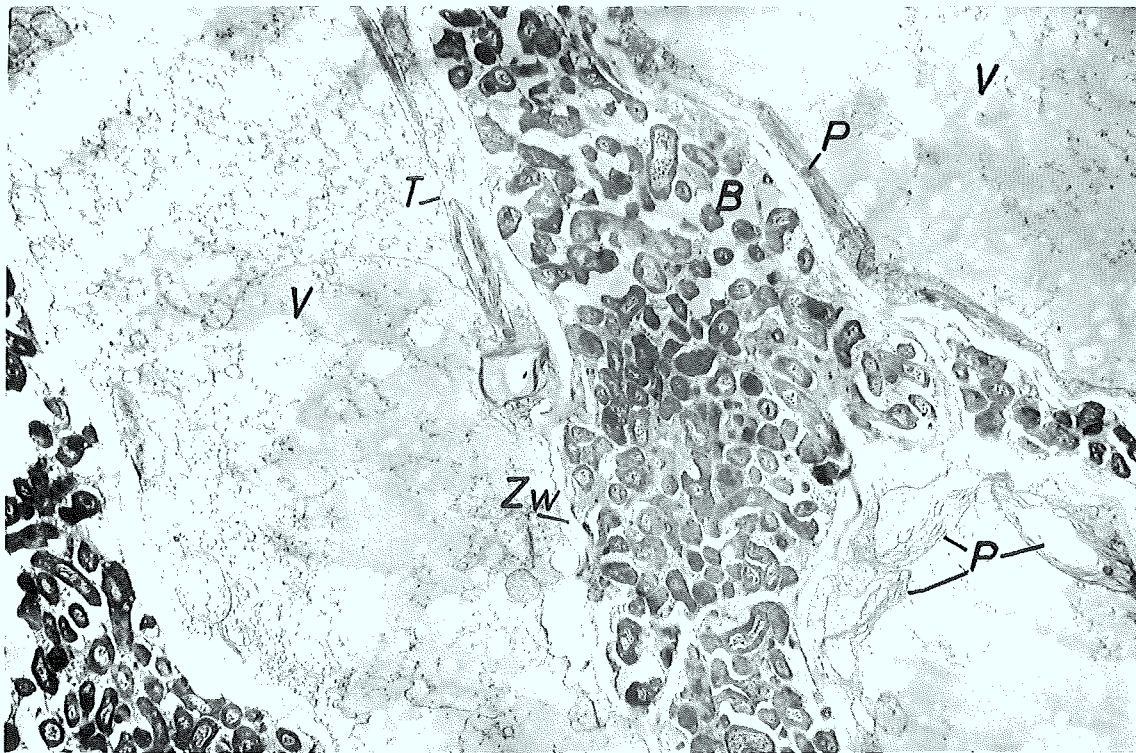


Abb. 60 Schnitt durch das bakterienhaltige Blattgewebe von *Psychotria bacteriophila*. (Ultradünnschnitt; Fixierung: Osmium-Chrom; Einbettung Vestopal; Vergrößerung 6000 x; B = Bakterien; P = Chloroplasten; T = Tonoplast; V = Vakuole; Zw = Zellwand.)

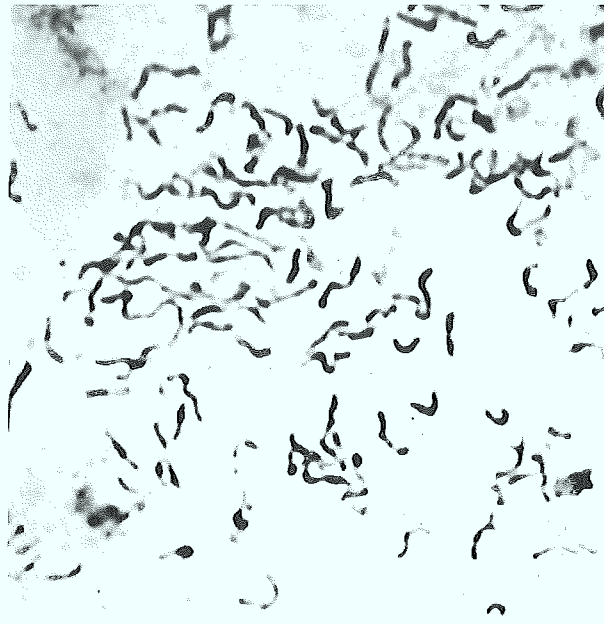


Abb. 61 Ausstrich aus einem Blattknötchen von *Psychotria maingayi*: bacterioide Formen. (Hitze-fixierung, Anfärbung mit Kristallviolett, Vergrößerung ca. 3000 x).

Diese Befunde deuten auf möglicherweise enge verwandtschaftliche Beziehungen der untersuchten Bakterienstämme zu den Rhizobiaceae hin. Das würde die von KNÖSEL (1963) vertretene Auffassung unterstützen. Wir können jedoch vorerst nur die hohe Hybridisierungsrate mit der DNA eines Angehörigen der Rhizobiaceae und die in Blattausstrichen nachgewiesenen Involutionenformen (Abb. 61), die eine auffallende Ähnlichkeit mit den Bacterioiden der Knöllchenbakterien (*Rhizobium*) haben, als Argument für verwandtschaftliche Beziehungen dieser Bakterien zur Familie der Rhizobiaceae anführen. Diese Annahme kann z. Zt. nur eine Arbeitshypothese sein, die weiterer Beweisführungen bedarf. Wir sind der Meinung, daß die unterschiedliche Klassifizierung der Blattsymbionten ihre Ursache auch darin haben kann, daß nicht immer die Symbionten selbst, sondern deren Begleitorganismen untersucht wurden. Wir können diese Möglichkeit in unserem Falle nicht völlig ausschließen. Der Beweis dafür, daß es sich tatsächlich um die Blattsymbionten handelt, müßte durch Infektion bakterienfreier Pflanzen geführt werden. Da hier eine zyklische Symbiose (s. oben) vorliegt,

und uns die Sterilisation der Pflanzen durch Hitzebehandlung bedenklich erscheint, sind noch experimentelle Schwierigkeiten zu überwinden. Möglicherweise kann auch hierbei das Antibioticum Vancomycin (S. 39) eingesetzt werden. Eine Klärung der abweichenden Klassifizierung der Blattsymbionten wird erst durch den Vergleich der von den einzelnen Autoren untersuchten Reinkulturen möglich sein. Leider hatten wir dazu noch keine Möglichkeit.

VI. Diskussion

Wie eingangs dargelegt, bestimmen noch ungeklärte Vorgänge bei der Induktion pflanzlicher Tumoren durch *Agrobacterium tumefaciens* unsere Untersuchungen. Nach wie vor ist das sog. "tumorinduzierende Prinzip" hypothetischer Natur. Zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung des TIP liegen vor, bei denen u. a. mit sterilen Extrakten aus virulenten Bakterien und Inkubation mit Wundpreßsäften (s. Abb. 1) oder in Gegenwart von Wuchsstoffen (u. a. MANIGAULT und STOLL 1958, 1960; THOMAS und KLEIN 1959; BENDER und BRUCKER 1956, 1958, 1959; RATHSACK und BRUCKER 1961; STAPP 1963; KLEIN 1965) die zellfreie Induktion von Pflanzentumoren gelungen zu sein schien. Diese Resultate erwiesen sich bei erneuter Überprüfung (BRAUN und STONIER 1960) als unsicher. Einmal war nicht immer die Sterilität der benutzten Extrakte garantiert und zum anderen unterschieden sich die durch Inokulation mit Protein-DNA-Gemischen hervorgerufenen Stengelwucherungen von echten "crown-gall"-Tumoren u. a. in früh einsetzender Nekrose und Nichttransplantierbarkeit (ALBERTINI et al. 1961).

Da demnach das virulente, lebende Bakterium direkt oder indirekt das TIP produzieren muß, führen Untersuchungen an virulenten Bakterien möglicherweise zu weiterführenden Erkenntnissen. Wir wählten deshalb die genetische Transformation als experimentellen Weg, um durch wechselseitigen Austausch genetischen Materials zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und Stämmen der Gattung *Rhizobium* Aufschlüsse über die genetischen Grundlagen der Fähigkeit zur Induktion pflanzlicher Tumoren

zu erlangen. Zum anderen bestand die Möglichkeit, Einblicke in die symbiontische Stickstoffassimilation zu bekommen.

Wir konnten zeigen, daß eine Übertragung der Virulenz durch genetische Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* auf Stämme von *Rhizobium* möglich ist. Für die Transformation DNA-147 + St. C \longrightarrow St. Cx wiesen wir an Hand zahlreicher Befunde nach, daß der untersuchte Bakterienstamm Cx durch Transformation entstanden sein muß. Wenn sich auch diese Folgerung auf Indizien stützt und die Fehlermöglichkeiten, die eine Transformation vortäuschen können, besonders berücksichtigt wurden, konnte doch sichergestellt werden, daß der transformierte Stamm sich in vieler Hinsicht sowohl vom Donator, als auch vom Acceptor unterscheidet (KERN 1965 a,b,c). Wieweit allerdings die auffällige Mittelstellung des Transformanten bezüglich verschiedener Eigenschaften des Donators und des Acceptors zufällig ist, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die Ausweitung vergleichender Analysen auf weitere, ebenfalls virulente Transformanten ist daher unbedingt notwendig.

Die unter unseren Versuchsbedingungen sehr niedrige Transformationsrate (Kapitel IV) erlaubt allerdings den direkten Nachweis einer Transformation noch nicht in der Art, wie er an den klassischen Objekten der Transformation wie *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus*, *Bacillus subtilis* u. a. möglich ist (SCHAEFFER 1964). Die Analyse des Transformationsvorganges selbst ist noch mit zahlreichen experimentellen Schwierigkeiten behaftet. Wie bereits betont, kann die optimale Kompetenz nur empirisch ermittelt werden. Sowohl durch Variierung der Kulturbedingungen vor Zugabe der DNA zum Transformationsansatz, als auch durch unterschiedliche Konzentrationen der Donator-DNA ist eine Steigerung der Transformationsrate durchaus möglich, wie z. B. ZELAZNA (1963, 1964 a und b) bei intra- und interspezifischen Transformationen bei Stämmen von *Rhizobium trifolii* zeigen konnte. Immerhin ergeben unsere quantitativen Transformationsversuche, bei denen wir die Streptomycinresistenz als Selektionsmerkmal benutzten, Transformationsraten, die mit denen von ZELAZNA (1963) vergleichbar sind,

Durch die reziproke Transformation, bei der wir die Resistenz gegenüber einem Sulfonamid (Marbadal) als Selektionsmerkmal benutzten, konnten wir den Beweis erbringen, daß *Agrobacterium tumefaciens* (St. 147) und *Rhizobium leguminosarum* (St. C) gegenseitig transformierbar sind, d.h. sowohl als Donator wie als Acceptor fungieren können (Kapitel IV).

Den Nachweis, daß die von dem transformierten Stamm Cx induzierten Wucherungen mit echten "crown-gall"-Tumoren vergleichbar sind, erbrachten wir durch vergleichende histologische Untersuchungen (S. 39 ff.). Auf die Schwierigkeiten, steriles Gewebe zu erhalten, damit Transplantationen durchzuführen bzw. das Verhalten in Gewebekultur zu studieren, wurde hingewiesen (S. 39). Wir glauben, im Vancomycin ein Antibioticum in Händen zu haben, welches Gewebe bakterienfrei macht, ohne dabei die Wirtspflanze zu schädigen. Das histologische Bild der durch Stamm Cx hervorgerufenen Wucherungen (Abb. 13) stützt aber unsere Annahme, daß wir es mit echten Tumoren zu tun haben.

Wie vorsichtig man jedoch in der Deutung morphologischer Befunde sein muß, haben wir an den "Pseudoknöllchen" gezeigt, die im Nodulationstest an den Pflanzenwurzeln von *Pisum sativum* auftraten (Abb. 21, 22 und 24). Hätten wir uns damit begnügt, die Fähigkeit zur Knöllchenbildung nur bei dem transformierten Stamm Cx und dem Acceptor (*Rhizobium leguminosarum*-Stamm C) gegenüber unbeimpften Kontrollpflanzen zu prüfen, so hätten wir den Schluß ziehen können, daß St. Cx eine ineffektive Knöllchenbildung verursacht (Abb. 19). Da aber auch in Gegenwart von *Agrobacterium tumefaciens* dieselben "Knöllchen" auftraten, die im elektronenmikroskopischen Bild die typischen Bilder einer *Rhizobium*infektion aufwiesen (Abb. 26, 28, 29 und 31), kamen wir zu einer anderen Schlußfolgerung (vergl. S. 59). Diese Beobachtungen sind nicht nur von Bedeutung für unsere Untersuchungen, sondern sie mahnen zur Vorsicht in der Auslegung von Versuchsergebnissen z.B. bei der Übertragung der Wirtsspezifität durch Transformation in der Gattung *Rhizobium*. In diesem Zusammenhang

sei auf die kritischen Untersuchungen von WAGENBRETH (1965) hingewiesen.

Die Feststellung, daß der transformierte Bakterienstamm (St. Cx) die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstoffassimilation verloren hat und offensichtlich auch keine ineffektiven Wurzelknöllchen induzieren kann, ist nicht überraschend. Da die symbiontische Effektivität von sehr vielen Faktoren sowohl von seiten der Pflanze, als auch von der betreffenden Bakterienart abhängt (NUTMAN 1965), kann die Veränderung eines der Faktoren zur Ineffektivität des Bakteriums führen. Diese Tatsache wird durch eine kürzlich erschienene Arbeit von KLECZOWSKA (1965) experimentell belegt. Diese Autorin führte Transformationen an Stämmen von *Rhizobium trifolii* durch, bei denen sie einen effektiven Stamm mit der DNA eines ineffektiven Stammes behandelte. Der als Acceptor verwendete *Rhizobium*-Stamm wurde daraufhin ineffektiv. Der Versuch, durch entsprechende Transformation ineffektive Bakterien effektiv zu machen, scheiterte in jedem Falle, obwohl die Transformationspartner in enger genetischer Beziehung standen und sich nur in der Effektivität voneinander unterschieden. Betrachtet man die genetische Konstellation von Pflanze und Bakterium (NUTMAN 1954 a, b) als Voraussetzung für eine effektive Nodulation, so ergibt sich, daß jede Veränderung eines an diesem Phänomen beteiligten Gens durch Transformation oder Mutation (vergl. SCHWINGHAMER 1962) weit häufiger zur Ineffektivität als zur Effektivität führt. In unserem Falle wurde allerdings nicht geprüft, ob Stamm Cx an anderen Wirtspflanzen als *Pisum sativum* Wurzelknöllchen hervorrufen kann.

Die stark ausgeprägte Spezialisierung der Knöllchenbakterien hat naturgemäß zu zahlreichen und sehr unterschiedlichen Ansichten über die Evolution dieser Mikroorganismen geführt. So nimmt z. B. NORRIS (1956) an, daß Rhizobien der tropischen *Vigna*-Gruppe mit relativ breitem Wirtsspektrum ursprünglich sind. Von ihnen sollen sich die Rhizobien der gemäßigten Breiten mit stärkerer Wirtsspezifität ableiten. Dieser Autor vermutet, daß sich die Knöllchenbakterien aus einem Typ phylogenetisch entwickelt haben müssen, der den rezenten "langsam

wachsenden" Rhizobien ähnlich war. BISSET (1955, 1958, 1959) leitet dagegen die Rhizobien von den freilebenden Stickstoffbindern *Azotobacter*, *Clostridium* und *Bacillus polymyxa* ab. Eine enge Beziehung der Rhizobien zur Gattung *Pseudomonas* wird ebenfalls angenommen (THIMANN 1964 S. 373). Auf Versuche, die Sternbildung (Abb. 33) als taxonomisches Merkmal zu verwenden, wurde bereits hingewiesen (S. 126, vergl. KNÖSEL 1963). Die Zusammenfassung der Gattungen *Agrobacterium*, *Rhizobium* und *Chromobacterium* zur Familie der *Rhizobiaceae* (s. BERGEY 1957) wird vielfach als wenig glücklich (vergl. THIMANN 1964, S. 373) und als nicht endgültig angesehen.

Aus diesem Grunde mußte zur Beweisführung für das Vorliegen einer genetischen Transformation zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum* auch die verwandtschaftliche Beziehung zwischen Donator und Acceptor nachgewiesen werden. Damit wurden wir zwangsläufig mit den Problemen konfrontiert, die mit der Taxonomie der *Rhizobiaceae* verbunden sind. GRAHAM (1963, 1964) kommt aufgrund seiner vorwiegend serologischen Untersuchungen zu der Auffassung, daß nur drei Arten innerhalb der Gattung *Rhizobium* abzugrenzen sind:

1. *Rhizobium meliloti*;
2. *Rhizobium leguminosarum*, eine Sammelbezeichnung für *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii* und *Rh. phaseoli* nach der Einteilung von BERGEY (1957);
3. *Phytomyxa japonicum*, eine neue Bezeichnung für *Rh. lupini*, *Rh. japonicum* und Bakterien der "cowpea"-Gruppe.

Darüberhinaus ergibt seine mit einem Computer vorgenommene Auswertung von Versuchsdaten, daß *A. tumefaciens* und *A. radiobacter* in die Gattung *Rhizobium* einbezogen werden müßten.

Unsere Ergebnisse sind mit diesen Vorstellungen gut zu vereinbaren. Zunächst spricht hierfür die von uns nachgewiesene gegenseitige Transformierbarkeit von *A. tumefaciens* und *Rh. leguminosarum* (S. 116 ff.). Eine weitere Bestätigung dieser verwandtschaftlichen Beziehungen ergibt sich auch aus den in Kapitel V mitgeteilten vorläufigen

Ergebnissen. Gemessen am Grad homologer Basensequenzen der betreffenden DNA, müssen *A. tumefaciens*, *A. radiobacter* und *Rh. leguminosarum*-Stamm C einer Organismengruppe angehören (vergl. Abb. 57).

In diesem Zusammenhang sei jedoch nochmals darauf hingewiesen, daß die dabei angewandte Hybridisierungsmethode nur eine Aussage über die Häufigkeit homologer DNA-Abschnitt mit komplementärer Basenfolge macht (S. 109). Im Hinblick auf die komplexen genetischen Funktionen der DNA hat diese Methode in ihrer Aussagekraft natürlich bestimmte Grenzen. Bei genetischen und taxonomischen Untersuchungen erweist sie sich als wertvolles Hilfsmittel, das zusammen mit morphologischen, serologischen und physiologisch-chemischen Analysen an der Klärung taxonomischer Fragen wesentlichen Anteil haben dürfte. Unseres Wissens liegen in der Literatur noch keine DNA-Hybridisierungsanalysen in der Familie der Rhizobiaceae vor.

Die sich abzeichnende verwandtschaftliche Beziehung der Blattsymbionten (S. 127 ff.) zur Familie der Rhizobiaceae ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Einmal würde die noch weiter zu sichernde taxonomische Stellung dieser Bakterien neue phylogenetische Gesichtspunkte ergeben. Von besonderer Bedeutung aber dürfte der hier vorliegende Modus der Stickstoffassimilation sein. Neuere Untersuchungen von CENTIFANTO und SILVER (1964) an Endophyten von *Psychotria bacteriophila* haben ergeben, daß sie in der Pflanze wie auch in Reinkultur Stickstoff assimilieren (s. auch NICHOLAS 1964) können. Das bedeutet, daß die Blattsymbionten asymbiontische wie symbiontische Stickstoffbinder sind. Hinzu kommt, daß sie nur in den Interzellularen der Wirtspflanze vorkommen (vergl. Abb. 60), im Gegensatz zu den Knöllchenbakterien, die inter- aber auch intrazellulär leben. Man könnte daraus schließen, daß für das Zustandekommen der Symbiose in den Blättern eine nicht so hohe Spezialisierung zwischen Wirtspflanze und Bakterium erforderlich ist wie bei der Symbiose der Leguminosen.

Auf grund dieser Überlegungen läßt sich folgende Entwicklungsreihe aufstellen:

1. freilebende Stickstoffbinder: Azotobacter, Clostridium, Bacillus polymyxa, einige Blaualgen u. a. ↓
2. asymbiontische und symbiontische Stickstoffbinder: interzelluläres Vorkommen in der Wirtspflanze, Blatt symbionten einiger Vertreter der Rubiaceae (Pavetta, Psychotria) ↓
3. symbiontische Stickstoffbinder: inter- und intrazelluläres Vorkommen in der Wirtspflanze, Symbionten (Rhizobium) bei Leguminosen und einigen Nicht-Leguminosen (Alnus, Hippophaë, Eleagnus, Ceanothus, Coriaria, Casuarina u. a.; s. BOND 1958). Die systematische Stellung der Endophyten dieser Pflanzen ist noch nicht völlig geklärt.

Diese Reihe ist nicht phylogenetisch zu verstehen, vielmehr soll in ihr nur die Mittelstellung der Blattendophyten zwischen asymbiontischen und symbiontischen Stickstoffbindern ausgedrückt werden.

In unseren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Virulenz des Erregers der "crown-gall"-Tumoren durch Transformation übertragbar ist. Damit werden zwar die Befunde von KLEIN et al. (1953; 1956) bestätigt, jedoch kann keine Aussage über die stoffliche Natur des geforderten "tumorinduzierenden Prinzips" (BRAUN 1947) gemacht werden. In unserem Falle wurde unter anderen Eigenschaften auch die Fähigkeit zur Induktion pflanzlicher Tumoren übertragen. Das bedeutet jedoch nicht, daß das TIP selbst übertragen wurde. Das Problem der Isolierung und Charakterisierung des TIP ist noch immer ungelöst (s. KLEIN 1965).

Es gibt Bedingungen, unter denen Tumoren wieder zu einem mehr oder weniger normalen Wachstum übergehen. Solche Übergänge von Tumoren in sog. Teratome (vergl. Abb. 17) zeigen, daß die Tumorisierung der Zellen nicht irreversibel ist. Damit wird die Annahme, daß die Tumorentstehung durch Veränderungen im Genom der umge-

wandelten Tumorzelle bedingt sei, zweifelhaft (vergl. RATHSACK und BRUCKER 1961). Die Ursachen der Bildung von Tumoren sind eher in Regulationsmechanismen zu suchen, die das "Ablesen" des genetischen Codes steuern. Nach den von JACOB und MONOD (s. BRESCH 1964) entwickelten Vorstellungen wird die Aktivität verschiedener Gene durch andere Gene, die sog. Operatorgene, kontrolliert. Das Aktivwerden der Gene ist mit dem Stoffwechsel der Zelle gekoppelt. Im Plasma gebildete Repressoren können durch spezifische Moleküle aktiviert bzw. inaktiviert werden. Die Repressoren reagieren andererseits mit spezifischen Operatorgenen und können Gengruppen in Funktion setzen oder blockieren. Äußere Einflüsse können dazu führen, daß die Zelle in einen stabilen Zustand versetzt wird, ohne daß hierbei das Genom verändert wird. Auf die Verhältnisse bei den "crown-gall"-Tumoren übertragen, könnte man annehmen, daß unter dem Einfluß tumorinduzierender Stoffe die durch den Wundreiz (vergl. Abb. 1) zu reger Zellteilung veranlaßten Gewebe daran gehindert werden, wieder in den normalen teilungsinaktiven Zustand zurückzukehren (s. BERGMANN 1964).

Das Tumorproblem ist somit eng verknüpft mit Fragen der Entwicklungsphysiologie. Eine Lösung des "crown-gall"-Problems ist nur von Erkenntnissen zu erwarten, die die Tumorforschung in ihren vielseitigen Arbeitsrichtungen in der Zukunft erbringen wird. Unsere Ergebnisse zeigen gewisse Möglichkeiten auf, die dabei von Bedeutung sein könnten. Die bei unserer Fragestellung berührten biologischen Probleme sind mannigfaltig. Durch Anwendung moderner Methoden sind weiterführende Informationen zu erwarten, die zur Klärung des Tumorproblems wie des Phänomens der symbiontischen Stickstoff-assimilation beitragen können.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

Als Beitrag zum vielschichtigen Problem der Entstehung pflanzlicher Tumoren - insbesondere der sog. Wurzelhalsgallen ("crown-gall") - werden Untersuchungen über die Virulenz tumorinduzierter Bakterien durchgeführt. Es wird geprüft, ob die Möglichkeit einer Übertragung der Fähigkeit zur Induktion von Tumoren von *Agrobacterium tumefaciens* auf Angehörige der Gattung *Rhizobium* besteht. Dabei wählten wir die genetische Transformation als experimentellen Weg und knüpften an die Untersuchungen von KLEIN und KLEIN (1953, 1956) an. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Mit der DNA aus virulenten Stämmen von *Agrobacterium tumefaciens* kann die Virulenz (Tumorinduktion) auf einige *Rhizobium*-Stämme übertragen werden.

2. Zur Sicherung einer erfolgten genetischen Transformation wird der Reaktionsansatz: DNA (aus *A. tumefaciens*-St. 147) + *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C näher untersucht und ein hieraus hervorgegangener virulenter Stamm (St. Cx) analysiert. An diesem Modell wird das Vorliegen einer genetischen Transformation wahrscheinlich gemacht.

3. Bei entsprechenden Kontrollversuchen werden die kritischen Fehlerquellen überprüft. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse erfüllen ebenso wie die physikalisch-chemische Beschaffenheit der verwendeten Donator-DNA alle Voraussetzungen für eine Transformation.

4. Die von einem transformierten *Rhizobium*-Stamm (St. Cx) an Pflanzenstengeln hervorgerufenen Geschwulste sind in ihrem histologischen Aufbau mit echten "crown-galls" vergleichbar.

5. Stamm Cx, als Transformant eines *Rhizobium*-Stammes (St. C), hat die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstoffassimilation verloren. Auf grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen an den "Pseudoknöllchen", die im Nodulationstest in Gegenwart des Transformanten (St. Cx) wie des Donators (*A. tumefaciens*-Stamm 147) an Erbsenwurzeln entstanden, wird deren Entstehung auf andere Ursachen zurück-

geführt.

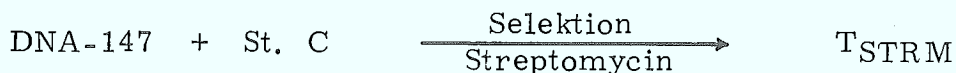
6. Vergleichende morphologische, physiologisch-chemische und serologische Untersuchungen an den Partnern der Transformation (s. Punkt 2) ergeben eine klare Differenzierung zwischen Donator, Acceptor und Transformant. In mancher Hinsicht nimmt der Transformant eine Mittelstellung zwischen entsprechenden Eigenschaften von Donator und Acceptor ein.

7. In bezug auf ihre Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen lassen sich die drei Bakterienstämme (St. 147, St. C und St. Cx) voneinander unterscheiden. Es wird angenommen, daß bei der genetischen Transformation auch die Eigenschaft Strahlenresistenz übertragen wurde. Einige Parameter - wie DNA -, RNA- und Proteingehalt sowie der prozentuale Anteil von Guanin-Cytosin-Basenpaaren an der betreffenden DNA - deren kausale Beziehung zur Strahlenresistenz in der Literatur angenommen wird - werden überprüft. Die Allgemeingültigkeit dieser Relationen wird diskutiert.

8. Es werden vergleichende Analysen an DNA-Präparaten aus den Partnern der Transformation (Donator, Acceptor und Transformant St. Cx, s. Punkt 2) durchgeführt. Bei gleichen physikalischen Eigenschaften und ähnlicher chemischer Zusammensetzung sind geringe Differenzen im summarischen Basengehalt der einzelnen Präparate festzustellen. Säulenchromatographische Fraktionierungen basisch hydrolysierter Apyrimidinsäuren ergeben keine spezifischen Unterschiede in der Verteilung von Purinsequenzen. Durch Hybridisierung (Agar-Methode) lassen sich dagegen zwischen den betreffenden DNA-Präparaten unterschiedliche Homologiegrade nachweisen, wobei die DNA des Transformanten in ihrem Gehalt an homologen, d.h. komplementären Basensequenzen, eine Mittelstellung zwischen der des Donators und des Acceptors einnimmt. Damit sind auch die auf der Basis der DNA an die Partner einer Transformation zu stellenden Voraussetzungen erfüllt.

9. Als weiterer Beweis für die Transformierbarkeit von Agro-

bacterium tumefaciens und Rhizobium leguminosarum wird die Transformationsrate bestimmt und dabei die Streptomycinresistenz als Selektionsmerkmal benutzt. Bei diesen Transformationsansätzen:



liegt die Transformationsrate bei $4-7 \times 10^{-6}$.

Die isolierten Transformanten hatten eine höhere Resistenz gegenüber Streptomycin und waren z.T. streptomycinabhängig. Serologisch stellen sie im Agglutinationstest teils selbständige Typen dar, teils zeigen sie Tendenzen zum Donator, zum Acceptor oder zu beiden.

10. Es konnte ferner bewiesen werden, daß auch eine reziproke Transformation zwischen Agrobacterium tumefaciens (St. 147) und Rhizobium leguminosarum (St. C) möglich ist. Wir verwendeten bei den Transformationsansätzen die Resistenz gegenüber Marbadal, einem Sulfonamid, als Selektionsmerkmal:



Die Transformationsrate liegt bei $13-16 \times 10^{-6}$

11. Die Anwendbarkeit der DNA-Agar-Methode zum Nachweis homologer Basensequenzen (s. Punkt 8) und damit zur Aufdeckung taxonomischer Beziehungen zwischen verschiedenen Bakterienstämmen wird in ersten Versuchen überprüft. Die mitgeteilten vorläufigen Ergebnisse an einigen Stämmen von Agrobacterium tumefaciens, A. radiobacter, A. rhizogenes sowie an verschiedenen Rhizobium-Stämmen zeichnen diese Methode als wertvolles Hilfsmittel aus. Interessante Beziehungen der Gattungen Agrobacterium und Rhizobium zu den Blattsymbionten in Arten von Psychotria zeichnen sich ab.

Die Untersuchungen wurden am Institut für Botanik und Mikrobiologie der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt. Dem Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. F. SCHWANITZ, meinem verstorbenen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. S. STRUGGER, und dem Vorstand der Kernforschungsanlage bin ich zu großem Dank verpflichtet. Meinem Kollegen, Herrn Dr. K.-H. v. WANGENHEIM, danke ich herzlich für seine Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Frau KOLB, geb. MÜHL, und Herrn BÖDDECKER sei für ihre zuverlässige und fleißige Mitarbeit aufrichtiger Dank gesagt.

VIII. Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

- A = Adenin
- A-T = Adenin-Thymin-Basenpaar der Desoxyribonucleinsäure
- C = Cytosin
- DNA = Desoxyribonucleinsäure, internationale Bezeichnung
(s. RAUEN 1964), früher DNS
- DNase = Desoxyribonuclease
- DNA-C = DNA aus *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C
- DNA-Cx = DNA aus dem transformierten Stamm Cx
- DNA-147 = DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147
- DNA-P = DNA-Phosphor, wird zur Mengenangabe von DNA verwendet
- E_{260} ; E_{280} etc. = Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge in $m\mu$ (260 $m\mu$, 280 $m\mu$ etc.)
- DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthylcellulose
- G = Guanin
- G-C = Guanin-Cytosin-Basenpaar der Desoxyribonucleinsäure
- MAK-Säule = methyliertes Albumin - Kieselgur, dient zur Fraktionierung von Nucleinsäuren
- P = Phosphor
- p = Phosphor in Mono- oder Diesterbindung in der DNA
- Pu = Purine: Adenin, Guanin
- Py = Pyrimidine: Cytosin, Thymin
- $\xi(P)$ = atomarer Extinktionskoeffizient auf der Basis von Phosphor
- ^{32}P = radioaktiver Phosphor
- RNA = Ribonucleinsäure, internationale Bezeichnung
(s. RAUEN 1964), früher RNS
- RNA-P = RNA-Phosphor, wird zur Mengenangabe von RNA benutzt
- RNase = Ribonuclease
- SSC = "standard-saline-citrate", Puffer bestehend aus
0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH 7
- St. C = *Rhizobium leguminosarum*-Stamm C
- St. Cx = transformierter Bakterienstamm Cx
- St. 147 = *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm 147

STRM = Streptomycin

T = Thymin

TCE = Trichloressigsäure

TIP = "Tumorinduzierendes Prinzip" nach BRAUN (1947)

Titriplex III = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure
(Merck)

T_m = Temperatur des halben Extinktionsanstieges bei der thermischen Denaturierung von Polynucleotiden, hier bei DNA

Tris = Tris-Puffer, Tris(hydroxymethyl)aminomethan

IX. Literaturverzeichnis

ADJANOHOOUN, E.

Étude cytologique et genèse des galles bactériennes des Rubiacées africaines du genre *Psychotria*.

C.R. Acad. Sci. (Paris) 245, 576-578 (1957).

ADLER, H.I., and J.C. COPELAND

Genetic analysis of radiation response in *E. coli*.

Genetics 47, 701-702 (1962).

ALEXANDER, H.E., G. LEIDY, and E. HAHN

Studies on the nature of *Hemophilus influenzae* cells susceptible to heritable changes by desoxyribonucleic acids.

J. Exptl. Med. 99, 505-553 (1954).

ALLEN, E.K., and O.N. ALLEN

Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia.

Bact. Rev. 14, 273-330 (1950).

ALLEN, E.K., and O.N. ALLEN

Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation.

Handb. d. Pflanzenphysiologie Vol. 8, 48-118 (1958).

ALLEN, O.N., and E.K. ALLEN

False nodulation on certain leguminous species.

Hawaiian Acad. Sci. Proc. P. Bishop Museum Special Publ. 35, 15-16 (1940).

ALLEN, E.K., O.N. ALLEN, and A.S. NEWMAN

Pseudonodulation of leguminous plants induced by 2-Bromo-3,5-Dichlorobenzoic acid.

Amer. J. Bot. 40, 429-435 (1953).

ALLOWAY, J.L.

Further observations on the use of pneumococcus extracts in effecting transformation of type in vitro.

J. Exptl. Med. 57, 265-278 (1933).

ALBERTINI, A. von, H.R. HOHL, P. MANIGAULT, Ch. STOLL et A. VOGEL

Similitude et différences entre des tumeurs expérimentales et le crown gall.

Phytopath. Z. 41, 55-58 (1961).

ANTWEILER, H. J.

Die quantitative Elektrophorese in der Medizin.
Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.

ARORA, N., F. SKOOG, and O. N. ALLEN

Kinetin-induced pseudonodules on tobacco roots.
Amer. J. Bot. 46, 610-613 (1959).

AVERY, O. T., C. M. MacLEOD, and M. McCARTY

Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III.
J. Exptl. Med. 79, 137-158 (1944).

BAKER, J. R.

Cytological technique.
Verlag Methuen und Co. Ltd. London, 1960.

BALASSA, G.

Genetic transformation of Rhizobium: A review of the work of R. BALASSA.
Bact. Rev. 27, 228-241 (1963).

BALASSA, R.

Durch Desoxyribonukleinsäuren induzierte Veränderungen an Rhizobien.
Naturwissenschaften 43, 133 (1956).

BALASSA, R.

Durch Desoxyribonukleinsäuren induzierte Veränderungen bei Rhizobien.
Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 4, 77-84 (1957a).

BALASSA, R.

Einige Bedingungen der Ausbildung einer durch Desoxyribonukleinsäuren induzierten niedrigen Streptomycinresistenz bei Rhizobien.
Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 4, 5-95 (1957b).

BALASSA, R.

Transformation of a strain of Rhizobium lupini.
Nature (Lond.) 188, 246 (1960).

BALASSA, R., and M. GABOR

Transformation of streptomycin markers in rough strains of *Rhizobium lupini*. Transformation of streptomycin-dependence. *Acta med. Acad. Sci. hung.* 11, 329-339 (1965).

BARNHART, B. J.

Residual activity of thermally denatured transforming deoxyribonucleic acid from *Haemophilus influenzae*. *J. Bact.* 89, 1271-1279 (1965).

BARNHART, B. J., and R. M. HERRIOTT

Penetration of deoxyribonucleic acid into *Hemophilus influenzae*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 76, 25-39 (1963).

BENDER, E. und W. BRUCKER

Studien zur zellfreien Tumorübertragung an Pflanzen. I. *Z. Bot.* 44, 531-542 (1956).

BENDER, E. und W. BRUCKER

Studien zur zellfreien Tumorübertragung an Pflanzen. II. *Z. Bot.* 46, 121-124 (1958).

BENDER, E. und W. BRUCKER

Weitere Versuche zur zellfreien Tumorerzeugung an Pflanzen. III. *Z. Bot.* 47, 258-271 (1959).

BENDICH, A.

Methods for the characterization of nucleic acids by base composition. *Methods in Enzymology* Vol. III, p. 715 ff. New York: Academic Press Inc. Publ. 1957.

BENDICH, A., J. R. FRESCO, H. S. ROSENKRANZ, and S. M. BELSER

Fractionation of deoxyribonucleic acid (DNA) by ion exchange. *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 3671-3673 (1955).

BERENBLUM, I., and E. CHAIN

An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.* 32, 295-298 (1938).

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl.

Baltimore: The Williams and Wilkins Comp. 1957.

BERGMANN, L.

Pflanzliche Tumoren und das Krebsproblem. *Naturwissenschaften* 51, 325-332 (1964).

BERNAERTS, M.J., and J. DE LEY

3-Ketoglycosides, new intermediates in the bacterial catabolism of disaccharides.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 30, 661 (1958).

BERNAERTS, M.J., and J. DE LEY

Microbiological formation and preparation of 3-ketoglycosides from disaccharides.

J. gen. Microbiol. 22, 129-136 (1960a).

BERNAERTS, M.J., and J. DE LEY

The structure of 3-ketoglycosides formed from disaccharides by certain bacteria.

J. gen. Microbiol. 22, 137-146 (1960b).

BERNAERTS, M.J., and J. DE LEY

An improved method for the preparation of 3-ketoglycosides.

Antonie v. Leeuwenhoek 27, 247-256 (1961).

BERNAERTS, M.J., and J. DE LEY

A biochemical test for crown gall bacteria.

Nature (Lond.) 197, 406-407 (1963).

BERNS, K.I., and C.A. THOMAS jr.

Isolation of high molecular weight DNA from Hemophilus influenzae.

J. molec. Biol. 11, 476-490 (1965).

BISSET, K.A.

Evidence from the cytology of Azotobacter chroococcum of a relationship with Rhizobium and the Bacillaceae.

J. gen. Microbiol. 13, 442-445 (1955).

BISSET, K.A.

Natural relationships of the nitrogen fixing bacteria.

Nature (Lond.) 182, 405 (1958).

BISSET, K.A.

Some characters of Rhizobium strains from tropical legumes.

J. gen. Microbiol. 20, 89-90 (1959).

BOND, G.

Symbiotic nitrogen fixation by non-legumes.

in "Nutrition of the legumes", Herausg. E.G. HALLSWORTH
Verl. Butterworths Scientific Publ., p. 216-231 (1958).

BONNIER, Ch.

Formation de tumeurs à Agrobacterium tumefaciens, sans blessure préalable.

Bull. de l'Institut Agronomique et des Stations de Recherches de Gembloux T. 28, N^o 3, 259-265 (1960).

BONNIER, Ch.

Tumeurs spontanées sur racines de légumineuses stériles. Leur signification possible dans la symbiose a Rhizobium.
Ann. Inst. Pasteur 100, 358-367 (1961).

BOPP, M.

Hemmung der Induktionsvorgänge bei Wurzelhalsgallen durch 2-Thiouracil und 5-Bromuracil.
Planta (Berl.) 54, 221-232 (1960).

BOPP, M.

Die Bedeutung der DNS für die primäre Zellveränderung bei der Induktion von Wurzelhalsgallen.
Z. Naturforsch. 16b, 336-347 (1961).

BOPP, M.

Wurzelhalsgallen und Zelldifferenzierung.
Naturw. Rdsch. 15, 349-359 (1963).

BOPP, M.

Hemmung der Crown-Gall-Entstehung durch Fluordesoxyuridin.
Z. Naturforsch. 19b, 64-71 (1964).

BOPP, M.

Time factor in the action of 5-fluorodeoxyuridine on the development of crown-galls.
Nature (Lond.) 207, 83-84 (1965).

BOPP, M. und E. LEPPLA

Vergleich der Histogenese der Wurzelhalsgallen an Blättern und Sproßachsen von *Kalanchoë daigremontiana*.
Planta (Berl.) 61, 36-55 (1964).

BOYLE, A.M., and R.M. PRICE

Vancomycin prevents crown gall.
Phytopath. 53, 1272-1275 (1963).

BRAUN, A.C.

Recent advances in the physiology of tumor formation in the crown gall disease of plants.
Growth 11, 325-337 (1947).

BRAUN, A.C., and T. STONIER

Morphology and physiology of plant tumors.
Protoplasmatologia Bd. X, (5a) 1-93 (1958).

BRENNER, S., and R.W. HORNE

A negative staining method for high resolution microscopy of viruses.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 34, 103 (1959).

BRESCH, C.

Klassische und molekulare Genetik.

Springer-Verl. Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1964.

BURROWS, W.

Textbook of Microbiology.

17. Aufl. Philadelphia, London: W.B. Saunders Comp. 1959.

BURTON, K.

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamin reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 62, 315-323 (1956).

BURTON, K., and G.B. PETERSEN

The frequencies of certain sequences of nucleotides in deoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 75, 17-27 (1960).

CATLIN, B.W., and L.S. CUNNINGHAM

Studies of extracellular and intracellular bacterial deoxyribonucleic acids.

J. gen. Microbiol. 19, 522-539 (1958).

CATLIN, B.W., and L.S. CUNNINGHAM

Genetic transformation of *Neisseria catarrhalis* by deoxyribonucleate preparations having different average base compositions.

J. gen. Microbiol. 37, 341-352 (1964).

CENTIFANTO, Y. M., and W. S. SILVER

Leaf-nodule symbiosis. I. Endophyte of *Psychotria bacteriophila*.

J. Bact. 88, 776-781 (1964).

CERIOTTI, G.

Determination of nucleic acids in animal tissues.

J. biol. Chem. 214, 59-70 (1955).

CHARGAFF, E., and S. ZAMENHOF

The isolation of highly polymerized desoxyribonucleic acid from yeast cells.

J. biol. Chem. 173, 327-335 (1948).

DART, P. J., and F. V. MERCER

Fine structure changes in the development of the nodules of *Trifolium subterraneum* L. and *Medicago tribuloides* Desr.
Arch. Mikrobiol. 49, 209-235 (1964).

DAVILA, C., P. CHARLES, and L. LEDOUX

The chromatography of nucleic acid preparations on DEAE-cellulose paper. I. Fractionation of deoxyribonucleic acid on paper strips or on centrifuged paper pulp.
J. Chromatog. 19, 382-395 (1965a).

DAVILA, C., P. CHARLES, and L. LEDOUX

The chromatography of nucleic acid preparations on DEAE-cellulose paper. II. Interrelations of the fractions.
J. Chromatog. 19, 396-403 (1965b).

DAWSON, M. H., and R. H. P. SIA

A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro.
J. Exptl. Med. 54, 681-699 (1931).

DE LEY, J., and A. RASSEL

DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*.
J. gen. Microbiol. 41, 85-91 (1965).

DOTY, P., J. MARMUR, J. EIGNER, and C. SCHILDKRAUT

Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: Physical chemical studies.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 461-476 (1960).

ELLIS, N. J., G. G. KALZ, and J. J. DONCASTER

Transformation in *Rhizobium trifolii*.
Canad. J. Microbiol. 8, 835-840 (1962).

EPSTEIN, H. T.

Identification of radiosensitive volume with nucleic acid volume.
Nature (Lond.) 171, 394-395 (1953).

ESSER, K. und R. KUENEN

Genetik der Pilze.
Springer-Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1965.

FABER, F.C. von

Das erbliche Zusammenleben von Bakterien und tropischen Pflanzen.
Jb. wiss. Bot. 51, 285-375 (1912).

FOX, M.S.

Recombination in transformation.
10th International Botanical Congress. Abstracts p. 230 (1964).

FOX, M.S., and R.D. HOTCHKISS

Initiation of bacterial transformation.
Nature (Lond.) 179, 1322-1325 (1957).

FRAENKEL-CONRAT, H.

Reaction of nucleic acid with formaldehyde.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 15, 307-309 (1954).

FREDERICQ, E., A. OTH, and F. FONTAINE

The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their
constituents.
J. molec. Biol. 3, 11-17 (1961).

FRONTALI, C., L.R. HILL, and L.G. SILVESTRI

The base composition of deoxyribonucleic acids of Streptomyces.
J. gen. Microbiol. 38, 243-250 (1965).

FUKUI, S.

Transformation of glucose to 3-ketoglucose with the cells of Agrobacterium tumefaciens.
Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 186-191 (1965).

FUKUI, S., and R.M. HOCHSTER

Conversion of disaccharides to the corresponding glycoside-3-uloses
by intact cells of Agrobacterium tumefaciens.
Cand. J. Biochem. 41, 2363-2371 (1963a).

FUKUI, S., R. DURBIN, E.E. GREBNER, and D.S. FEINGOLD

The conversion of sucrose to α -D-ribo-hexopyranosyl-3-ulose-
 β -D-fructofuranoside by cultures of Agrobacterium tumefaciens.
Bull. Res. Coun. Israel A 11, 262-268 (1963b).

GANESAN, A.T., and J. LEDERBERG

Physical and biological studies on transforming DNA.
J. molec. Biol. 9, 683-695 (1964).

GARTLER, S.M.

Cellular uptake of deoxyribonucleic acid by human tissue culture cells.

Nature (Lond.) 184, 1505-1506 (1959).

GAUTHERET, R.J.

La culture des tissus végétaux.

Verl. Masson u. Cie. Paris 1959.

GRAHAM, P.H.

Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes.

Antonie v. Leeuwenhoek 29, 281-291 (1963).

GRAHAM, P.H.

The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodules bacteria of legumes.

J. gen. Microbiol. 35, 511-517 (1964).

GREBNER, E.E., R. DURBIN, and D.S. FEINGOLD

Formation of β -D-fructofuranosyl- α -D-ribohexopyranoside-3-ulose by a *Micrococcus* sp.

Nature (Lond.) 201, 419-420 (1964).

GRIFFITH, F.

Significance of pneumococcal types.

J. Hyg. 27, 113-159 (1928).

GRILLI, M.

Osservazioni sui rapporti tra cellule ospiti e Rhizobi nei tubercoli radicali di pisello (*Pisum sativum*).

Caryologia 16, 561-594 (1963).

GUNTER, S.E., and H.I. KOHN

The effect of x-rays on the survival of bacteria and yeast. I. A comparative study of the dose-survival curves of *Azotobacter agile*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, and *Saccharomyces cerevisiae* irradiated in the resting state.

J. Bact. 71, 571-581 (1955).

HABERMANN, V.

Studies on deoxyribonucleic acids. I. The preparation of apyrimidinic deoxyribonucleic acids.

Cs. Chem. Commun. 26, 3147-3156 (1961).

HABERMANN, V.

Studies on deoxyribonucleic acids. II. Degradation of deoxyribonucleic acids to purine nucleotide sequences.
Cs. Chem. Commun. 28, 510-517 (1963a).

HABERMANN, V., and E. MAIDLOVA

Studies on deoxyribonucleic acids. III. Distribution of purine nucleotides in the deoxyribonucleic acid molecule from calf thymus.
Cs. Chem. Commun. 28, 2537-2538 (1963b).

HABERMANN, V.

The participation of nucleotides in the purine and pyrimidine isopliths in the DNA molecule.
Physikalische Chemie biogener Makromoleküle. II.
Jenaer Symposium 1963, Akademie-Verl. Berlin, p. 411-415 (1964).

HASSID, W.Z., and S. ABRAHAM

Chemical procedures for analysis of polysaccharides.
Methods in Enzymology Vol. III, p. 34 ff. New York: Academic Press Inc., Publ. 1957.

HAYNES, R.H.

Molecular localisation of radiation damage relevant to bacterial inactivation.
Physical Processes in Radiation Biology, p. 51-72, New York, London: Academic Press 1964.

HEUMANN, W.

Die Methodik der Kreuzung sternbildender Bakterien.
Biol. Zbl. 81, 341-354 (1962).

HILLIER, J., G. KNAYSI, and R.F. BAKER

New preparation techniques for the electron microscopy of bacteria.
J. Bact. 56, 569-576 (1948).

HOBBS, G., D.C. CANN, G. GOWLAND, and H.D. BYERS

A serological approach to the genus *Pseudomonas*.
J. appl. Bact. 27, 83-92 (1964).

HOTCHKISS, R.D.

Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 40, 49-55 (1954).

HOHL, H.R.

Über die submikroskopische Struktur hyperplastischer Gewebe von *Datura stramonium* L.
Phytopath. Z. 40, 317-356 (1961).

HOUWINK, A.L., and W. van ITERSSEN

Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 5, 10-44 (1950).

HOYER, B.H., B.J. McCARTHY, and E.T. BOLTON

A molecular approach in the systematics of higher organisms.
Science 144, 959-967 (1964).

JANKE, A.

Arbeitsmethoden der Mikrobiologie.
I. Band: Allgemeine mikrobiologische Methoden.
2. Aufl. Dresden, Leipzig: Th. Steinkopf 1946.

KAPLAN, H.S., J.D. EARLE, and F.L. HOWSDEN

The role of purine and pyrimidine bases and their analogues in radiation sensitivity.
J. Cell. and Comp. Physiol. 64, Sup. 1, 69-90 (1964).

KAPLAN, H.S., and L.E. MOSES

Biological complexity and radiosensitivity.
Science 145, 21-25 (1964).

KAPLAN, H.S., and R. ZAVARINE

Correlation of bacterial radiosensitivity and DNA base composition.
Biochem. biophys. Res. Comm. 8, 432-436 (1962).

KERN, H.

Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren in grünen Blättern.
Planta (Berl.) 53, 595-601 (1959).

KERN, H.

Biochemische Untersuchungen an verschiedenen Plasmotypen der Gattung *Epilobium*. (Ein Beitrag zum Problem der Plasmavererbung.)
II. Untersuchungen an Nucleinsäuren.
Flora (Jena) 151, 303-313 (1961).

KERN, H.

Untersuchungen zur genetischen Transformation zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium spec.* I. Übertragung der Fähigkeit zur Induktion pflanzlicher Tumoren auf *Rhizobium spec.*
Arch. Mikrobiol. 51, 140-155 (1965a).

KERN, H.

II. Vergleichende morphologische, physiologische und biochemische Untersuchungen an den Partnern einer Transformation.
Arch. Mikrobiol. 52, 206-223 (1965b).

KERN, H.

III. Vergleichende Analysen der DNA aus den Partnern einer Transformation.
Arch. Mikrobiol. 52, 325-344 (1965c).

KERN, H.

Zum Nachweis der Virulenz bei *Agrobacterium tumefaciens*.
Arch. Mikrobiol. 53, 92-106 (1966).

KERR, S.E., K. SERAIDARIAN, and M. WARGON

Studies on ribonucleic acid. II. Methods of analysis.
J. biol. Chem. 181, 761-771 (1949).

KIRBY, K.S.

A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein.
Biochem. J. 66, 495-504 (1957).

KIRBY, K.S.

The preparation of deoxyribonucleic acids by the p-aminosalicylate-phenol method.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 36, 117-124 (1959).

KIT, S.

Fractionation of deoxyribonucleic acid preparations on substituted cellulose anion exchangers.
Arch. Biochem. 87, 318-329 (1960).

KLECZOWSKA, J.

Mutations in symbiotic effectiveness in *Rhizobium trifolii* caused by transforming DNA and other agents.
J. gen. Microbiol. 40, 377-383 (1965).

KLEIN, D.T., and A.C. BRAUN

On the presumed sterile induction of plant tumors.
Science 131, 1612 (1960).

KLEIN, D.T., and R.M. KLEIN

Transmittance of tumor-inducing ability to avirulent crown-gall
and related bacteria.
J. Bact. 66, 220-228 (1953).

KLEIN, D.T., and R.M. KLEIN

Quantitative aspects of transformation of virulence in *Agrobacterium tumefaciens*.
J. Bact. 72, 308-313 (1956).

KLEIN, D.T., and G.K.K. LINK

The etiology of crown-gall.
Quart. Rev. Biol. 30, 207-277 (1955).

KLEIN, R.M.

The physiology of bacterial tumors in plants and of habituation.
Handb. d. Pflanzenphysiologie Band XV, 2 p. 209-235
Springer-Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1965.

KLEIN, P.

Bakteriologische Grundlagen der Chemotherapeutischen Laboratoriums-
praxis.
Springer-Verl. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957.

KLEINSCHMIDT, A.K.

Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen.
Z. Naturforsch. 14b, 770-779 (1959).

KNÖSEL, D.

Prüfung von Bakterien auf Fähigkeit zur Sternbildung.
Zbl. Bakt. II. Abt. 116, 79-100 (1963a).

KNÖSEL, D.

Karyologische Untersuchungen an sternbildenden Bakterien ver-
mittels Färbe- und enzymatischer Verfahren, phasen- und elektronen-
optisch.
Zbl. Bakt. II. Abt. 116, 113-130 (1963b).

KOMAGATA, K.

Differentiation of genus *Pseudomonas* and related aerobic bacteria.
J. gen. appl. Microbiol. (Tokyo) 7, 282-299 (1961).

KUPILA, S.

Anatomical and cytological comparison of the development of crown-gall in three host species.
Ann. Bot. Soc. "Vanamo" 30, 1-89 (1958).

LANEN, J.M. van, I.L. BALDWIN, and A.J. RIKER

Attenuation of crown gall bacteria by cultivation in media containing glycine.
J. Bact. 63, 715-721 (1952).

LANG, D., A.K. KLEINSCHMIDT und R.K. ZAHN

Konfiguration und Längenverteilung von DNA-Molekülen in Lösung.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 88, 142-154 (1964).

LEHMAN, I.R.

The deoxyribonucleases of Escherichia coli. I. Purification and properties of a phosphodiesterase.
J. biol. Chem. 235, 1479-1487 (1960).

LEIFSON, E.

Atlas of Bacterial Flagellation.
New York, London: Academic Press 1960.

LERMAN, L.S., and L.J. TOLMACH

Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in pneumococcus.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 26, 68-82 (1957).

LIMBERK, J.

Differentialdiagnostische Wirtspflanzen für Agrobacterium tumefaciens und Agrobacterium rhizogenes.
Biol. plantarum (Praha) 4, 220-225 (1962).

LITT, M., J. MARMUR, H.E. EPHRUSSI-TAYLOR, and P. DOTY

The dependence of pneumococcal transformation on the molecular weight of deoxyribose nucleic acid.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 144-152 (1958).

LJUNGGREN, H.

Transfer of virulence in Rhizobium trifolii.
Nature (Lond.) 191, 623 (1961).

MacGEE, J., and M. DOUDOROFF

A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation.
J. biol. Chem. 210, 617 (1954).

MacHATTIE, L.A., and C.A. THOMAS jr.

DNA from bacteriophage lamda: molecular length and conformation.
Science 144, 1142-1144 (1964).

MANIGAULT, P., et Ch. STOLL

Induction aseptique d'une tumeur végétale (crown-gall). Partici-
pation des acides nucléiques de la bactérie, Agrobacterium tume-
faciens (Smith et Townsend).
Ann. Inst. Pasteur 95, 793-795 (1958).

MANIGAULT, P., et Ch. STOLL

Induction et croissance de tumeurs végétales exemptes de bactéries.
Phytopath. Z. 38, 1-12 (1960).

MANIL, P.

The Legume-Rhizobia Symbiosis.
in "Nutrition of the legumes", Herausg. E.G. HALLSWORTH
Verl. Butterworths Scientific. Publ. p. 124-133 (1958).

MARMUR, J.

A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-
organisms.
J. molec. Biol. 3, 208-218 (1961).

MARMUR, J., and P. DOTY

Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. I. Dependence on compo-
sition of the configurational stability of deoxyribonucleic acids.
Nature (Lond.) 183, 1427-1429 (1959).

MARMUR, J., and P. DOTY

Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid
from its thermal denaturation temperature.
J. molec. Biol. 5, 109-118 (1962).

MARMUR, J., and D. LANE

Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic
acids: Biological studies.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 453-461 (1960).

MARMUR, J., C. L. SCHILDKRAUT, and P. DOTY

The reversible denaturation of DNA and its use in studies of
nucleic acid homologies and the biological relatedness of micro-
organisms.
Deoxyribonucleic acid. Structure, synthesis and function.
Proceedings of the 11th Annual Reunion of the Societe De Chimie
Physique, p. 69-79. Oxford, London, New York, Paris:
Pergamon Press 1962.

McCARTHY, B.J., and E. T. BOLTON

An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms.

Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50, 156-164 (1963).

McCARTY, M., and O.T. AVERY

Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance.

J. Exptl. Med. 83, 89-96 (1946); weitere Arbeiten s. b. RAVIN (1961) und SCHAEFFER (1964).

McCORMICK, M.H., W.M. STARK, G.E. PITTEGER, R.C. PITTEGER, and J.M. McGUIRE

Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biological properties. Antibiotics Ann. 1955/56, p. 606-611.

MERCK, E.

Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden.

10. Aufl. Weinheim, Bergstr.: Verlag Chemie 1962.

MÜLLER, H.P.

Beziehungen zwischen der Streptomycin- und Strahlenresistenz bei *Azotobacter chroococcum* Beij.

Arch. Mikrobiol. 53, 59-66 (1966).

NICHOLAS, D.J.D.

Biological fixation of nitrogen by asymbiotic and symbiotic systems. 10th International Botanical Congress, Abstr. p. 161 (1964).

NORRIS, D.O.

Legumes and the Rhizobium symbiosis.

Empire J. Exp. Agr. 24, 247-270 (1956).

NUTMAN, P.S.

Nuclear and cytoplasmic inheritance of resistance to infection by nodule bacteria in red clover.

Heredity 3, 263-292 (1949).

NUTMAN, P.S.

Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. I. Variation in host and bacteria.

Heredity 8, 35-46 (1954a).

NUTMAN, P.S.

Symbiotic effectiveness in nodulated red clover. II. A major gene for ineffectiveness in the host.

Heredity 8, 47-60 (1954b).

NUTMAN, P.S.

The influence of the legume in root-nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions.
Biol. Rev. 31, 109-151 (1956).

NUTMAN, P.S.

Origin and developmental physiology of root nodules.
Handb. d. Pflanzenphysiologie Vol. XV, 1, p. 1355-1379 (1965).

OPPENORTH, W.F.F.

Transformation in yeast: evidence of a real genetic change by action of DNA.
Nature (Lond.) 193, 706 (1962).

OUCHTERLONY, Ö.

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy 5, 1-78 (1958).

PAKULA, R., E. HULANICKA, and W. WALCZAK

Transformation reactions between streptococci, pneumococci, and staphylococci.
Bull. Acad. pol. Sci. Cl. 2, 6, 325-328 (1958).

PETERSEN, G.B.

The distribution of nucleotides in deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 87, 495-500 (1963).

PODGAJETSKAJA, D.J., V.M. BRESLER, I.M. SURIKOV, T.N. IGNATOVA, and J.M. OLENOV

The transforming action of deoxyribonucleic acid isolated from sarcolysine-resistant tumors on sarcolysine-sensitive tumors.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 80, 110-115 (1964).

PUCK, T.T.

In vitro studies on the radiation biology of mammalian cells.
Progr. Biophys. 10, 238-258 (1960).

PUTTE, P. van de, C. WESTENBROEK, and R. RÖRSCH

The relationship between gene-controlled radiation resistance and filament formation in *Escherichia coli*.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 76, 247-256 (1963).

RAGGIO, M., and N. RAGGIO

Root nodules.
Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 109-128 (1962).

RATHSACK, R. und W. BRUCKER

Der Pflanzenkrebs, ein Beitrag zum allgemeinen Geschwulstproblem.
Die Neue Brehm-Bücherei, Verl. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt,
1961.

RAUEN, H.M.

Biochemisches Taschenbuch.
2. Aufl. Teil I, p. 734 ff., Springer-Verl. Berlin, Göttingen,
Heidelberg, 1964.

RAVIN, A.W.

The genetics of transformation.
Advanc. Genet. 10, 61-163 (1961).

ROMEIS, B.

Mikroskopische Technik.
Verl. R. Oldenbourg, München 1948.

RUDIN, P.E.

Versuche zur Physiologie der Knöllchenbildung bei *Pisum sativum*
L.
Phytopath. Z. 26, 57-80 (1956)

SAVITSKY, J.P., and F. STAND

A method for the preparation of mammalian deoxyribonucleic acid.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 114, 419-422 (1966).

SCHAEDE, R.

Die pflanzlichen Symbiosen.
Verl. G. Fischer, Stuttgart, 3. Aufl. 1962.

SCHAEFFER, P.

Transformation.
The Bacteria, Vol. V, p. 87-153, New York, London: Academic
Press 1964.

SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR, and P. DOTY

The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies
of DNA homologies.
J. molec. Biol. 3, 595-617 (1961).

SCHWARTZ, W.

Bakterien- und Actinomyceten-Symbiosen.
Handb. d. Pflanzenphysiologie Vol. XI, 546-576 (1959).

SCHWINGHAMER, E. A.

Studies on induced variation in the Rhizobia. I. Defined media and nodulation test techniques.
Appl. Microbiol. 8, 349-352 (1960).

SCHWINGHAMER, E. A.

Studies on induced variation in the Rhizobia. III. Host range modification of *Rhizobium trifolii* by spontaneous and radiation-induced mutation.
Amer. J. Bot. 49, 269-277 (1962).

SEN, M., and S. P. SEN

Interspecific transformation in *Azotobacter*.
J. gen. Microbiol. 41, 1-6 (1965).

SHAPIRO, H. S., and E. CHARGAFF

Studies on the nucleotide arrangement in deoxyribonucleic acids. I. The relationship between the production of pyrimidine nucleoside 3',5'-diphosphates and specific features of nucleotide sequences.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 26, 596-608 (1957a).

SHAPIRO, H. S., and E. CHARGAFF

II. Differential analysis of pyrimidine nucleotide distribution as a method of characterization.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 26, 608-623 (1957b).

SHAPIRO, H. S., and E. CHARGAFF

IV. Patterns of nucleotide sequence in the deoxyribonucleic acid of rye germ and its fractions.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 39, 68-82 (1960).

SMITH, E. F., N. A. BROWN, and C. O. TOWNSEND

Crown-gall of plants: its cause and remedy.
Government Printing Office, Washington 1911.

SPARROW, A. H., and H. J. EVANS

Nuclear factors affecting radiosensitivity. I. The influence of nuclear size and structure, chromosome complement, and DNA content.
Brookhaven Symposium 14, 76-100 (1961).

SPENCER, J. H., and E. CHARGAFF

Pyrimidine nucleotide sequences in deoxyribonucleic acids.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 51, 209-211 (1961).

STAPP, C.

Der derzeitige Stand unserer Kenntnisse über pflanzliche Tumoren.
Zbl. Bakt. II. Abt. 107, 172-189 (1953).

STAPP, C.

Pflanzenpathogene Bakterien.
Berlin und Hamburg: Parey, p. 69-101 (1958).

STAPP, C.

Das bakterielle Pflanzenkrebsproblem in phytopathologischer und
allgemein biologischer Sicht.
Angew. Bot. 37, 103-130 (1963).

STAPP, C. und H. Bortels

Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, *Pseudomonas tumefaciens*.
II. Mitteilung: Über den Lebenskreislauf von *Pseudomonas tumefaciens*.
Z. Parasitenk. 4, 101-125 (1931).

STAPP, C. und D. KNÖSEL

Zur Genetik sternbildender Bakterien.
Zbl. Bakt. II. Abt. 108, 243-259 (1954).

STARR, M.P.

The nutrition of phytopathogenic bacteria. II. The genus *Agrobacterium*.
J. Bact. 52, 187-194 (1946).

STENT, G.

Mating in the reproduction of bacterial viruses.
Advanc. Virus Res. 5, 95-149 (1958).

STEINER, R.F., and R.F. BEERS

Polynucleotides. Natural and Synthetic Nucleic Acids.
Amsterdam, London, New York, Princeton: Elsevier Publ. Comp.
1961

STOLP, H.

Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen
und höheren Pflanzen.
Arch. Mikrobiol. 17, 1-29 (1952).

SUEOKA, N., and T.-Y. CHENG

Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column.
J. molec. Biol. 4, 161-172 (1962).

SUEOKA, N., J. MARMUR, and P. DOTY

Heterogeneity in deoxyribonucleic acids. II. Dependence of the density of deoxyribonucleic acids on guanine-cytosine content. Nature (Lond.) 183, 1429-1431 (1959).

SUEOKA, N.

Compositional variation and heterogeneity of nucleic acids and protein in bacteria. The Bacteria Vol. V, p. 419-443 (1964).

SZYBALSKA, H.E., and W. SZYBALSKI

Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 2026-2034 (1962).

SZYBALSKI, W.

Gradient plate technique for study of bacterial resistance. Science 116, 46-48 (1952).

TAMM, C., M.E. HODES, and E. CHARGAFF

The formation of apurinic acid from the desoxyribonucleic acid of calf thymus. J. biol. Chem. 195, 49-63 (1952).

TERZI, M.

Comparative analysis of inactivating efficiency of radiation on different organisms. Nature (Lond.) 191, 461-463 (1961).

THIMANN, K.V.

Das Leben der Bakterien. Verl. G. Fischer, p. 364 ff. 1964.

THOMAS, A.J., and R.M. KLEIN

In vitro synthesis of the crown-gall tumor inducing principle. Nature (Lond.) 183, 113-114 (1959).

TOMASZ, A., and R.D. HOTCHKISS

Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 480-487 (1964).

VEKEN, J.A. van der, D.H.M. van SLOGTEREN, and J.P.H. van der WANT

Immunological Methods. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 5, p. 422-463. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1962.

VIRTANEN, A.I.

The biology and chemistry of nitrogen fixation by legume bacteria.
Biol. Rev. 22, 239-269 (1947).

WAGENBRETH, D.

Ein Beitrag zur systematischen Einordnung der Knöllchenbakterien durch Bestimmung des relativen Basengehaltes ihrer Desoxyribonucleinsäuren.

Flora (Jena) 151, 219-230 (1961).

WAGENBRETH, D.

Zur Transformierbarkeit der Knöllchenbakterien.

Arch. Mikrobiol. 52, 154-168 (1965).

WANGENHEIM, K.-H. von

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung normaler und röntgenbestrahlter Zellen des Weizenembryos.

Radiation Bot. 5, 403-416 (1965).

WEBER, E.

Grundriß der Biologischen Statistik.

3. Aufl. Jena Verl. G. Fischer 1957.

WISE, C.S., R.J. DIMLER, H.A. DAVIS, and C.E. RIST

Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations.

Analyt. Chem. 27, 33-36 (1955).

WYATT, G.R.

The Nucleic Acids.

(Hrsg. CHARGAFF and DAVIDSON) p. 243 ff. New York: Academic Press 1955.

YAMANE, G., and S. HIGASHI

Interspecific transformation of host-specificity in root nodule bacteria.

Bot. Mag. Tokyo 76, 149-154 (1963).

ZAMENHOF, S.

Preparation and assay of deoxyribonucleic acid from animal tissue.
Methods Enzymol. 3, 696-704 (1957).

ZAMENHOF, S., H.E. ALEXANDER, and G. LEIDY

Studies on the chemistry of the transforming activity. I. Resistance to physical and chemical agents.

J. Exptl. Med. 98, 373-397 (1953).

ZELAZNA, I.

Transformation of Rhizobium.

Acta microbiol. pol. 12, 166-174 (1963).

ZELAZNA, I.

Transformation in Rhizobium trifolii. I. The influence of some factors on the transformation.

Acta microbiol. pol. 13, 283-289 (1964a).

ZELAZNA, I.

Transformation in Rhizobium trifolii. II. Development of competence.

Acta microbiol. pol. 13, 291-298 (1964b).

