

Transposon Tn5를 이용한 Slow growing *Rhizobium japonicum*의 돌연변이 유도

김성훈·이 윤·선대규·유익동
한국과학기술원 유전공학센터

Mutagenesis of Slow growing *Rhizobium japonicum* by Transposon Tn5

Kim, Sung-Hoon, Yoon Rhee, Dae-Kyu Sun and Ick-Dong Yoo
Genetic Engineering Center, KAIST, Seoul, Korea

ABSTRACT: The spectinomycin resistant strain of slow growing *R. japonicum* R-168 was selected to be participated in conjugation with *E. coli* WA803/pGS9. Tn5 was introduced from suicide vector pGS9 into *R. japonicum* R-168 *spr'* chromosome at the frequency of 1.0×10^{-5} – 5.0×10^{-7} and the transconjugants were selected on the yeast extract-mannitol plate containing kanamycin ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) and spectinomycin ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) after 8-9 days incubation. All transconjugants we tested were found to contain Tn 5 DNA on their genome, which was confirmed by Southern hybridization experiments. *R. japonicum* RMa75, which had been selected through plant test, was found to be defective in symbiotic nitrogen fixing ability and the production of leghemoglobin in soybean nodules formed by the inoculation of this mutant. In addition, this mutant strain hardly developed nitrogenase activity asymbiotically in contrast with the wild type strain, indicating that some nitrogen fixing gene might be blocked in this strain and the production of leghemoglobin could be decreased by the interference in nitrogen fixing genes.

KEY WORDS □ Transposon Tn5, Mutagenesis, *Rhizobium japonicum*

생물학적 질소고정중 *Rhizobium*속과 두과식물에 의한 공생적 질소고정연구는 두과식물의 생산성 증대 및 공생관계에 대한 학문적 중요성으로 인해 그 연구가 최근 급속히 진행되었다(Downie *et al.*, 1983; Fuller *et al.*, 1983; Hirsch *et al.*, 1983). 한편 slow growing *Rhizobium japonicum*과 대두(Soybean; *Glycin max* L.)와의 공생에 관한 연구는, fast growing *Rhizobium* (Beringer *et al.*, 1978; Casadeus and Olivares, 1979) 및 free-living nitrogen fixer인 *Klebsiella* (Beynon *et al.*, 1983; Merrick *et al.*, 1980) 등에 비해 질소고정에 필요한 유전자의 분리 및 동정이 어려워 비교적 연구가 되어 있지 않은 편이다.

특히 slow growing *Rhizobium japonicum*의 질소고정에 관여하는 유전자들은 비공생 조건하에서는 발현되지 않을 뿐만 아니라 fast grower에서처럼 indigeneous plasmid에 존재한다는 증거도 없으므로 유전자를 추적하고 분석하기에는 많은 어려움이 뒤따랐다. 이러한 어려움을 극복하기 위한 방법으로 최근 transposon을 이용하여 돌연변이 시키는 방법이 개발되었고(Ruvkun and Ausubel, 1981; Ruvkun *et al.*, 1982; Scott *et al.*, 1982) 그중 한가지 방법으로 suicide vector인 pGS9를 사용하는 방법이 시도되었다(Rostas *et al.*, 1984; Selvaraj and Iyer, 1983). 이는 conjugation에 의하여 pGS9이 recipient

strain에 도입된 후 Tn5가 DNA상의 한 부위에 삽입되어 돌연변이를 유발시키는 방법으로, 이 방법을 이용하여 symbiosis에 필요한 유전자내에 Tn5가 삽입된 mutants만을 선별하여 mutation된 유전자의 분리 및 동정에 관련된 연구가 일부 실시되었다(Rostas *et al.*, 1984; Selvaraj and Iyer, 1983). 본 연구에서는 한국에서 분리한 slow growing *Rhizobium japonicum* R-168을 대상으로 Tn5를 함유한 suicide vector를 사용한 mutagenesis의 가능성을 검토하였고, 아울러 transconjugant들 중에서 $\text{fix}^- \text{nod}^+$ mutant를 분리하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Strains and Media

Tn5를 함유한 vector pGS9의 conjugation donor로 사용한 *E. coli* WA803/pGS9은 Dr. V. N. Iyer(Selvaraj and Iyer, 1983)로부터 분양받았으며 recipient는 본 실험실에서 선별한 slow growing *R. japonicum* R-168로부터 spectinomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 대해 내성을 갖는 spontaneous mutant를 분리하여 실험에 사용하였다. *E. coli*의 배양에는 LB배지, *Rhizobium* 배양시 기본배지로는 yeast extract-mannitol배지(Jordan, 1984), conjugation시에는 PA 배지(Bactopeptone 0.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g per liter)를 사용하였다. Free living 조건에서의 질소 고정활성(ARA) 측정을 위해서는 KS배지(L-glutamic acid 1g, sucrose 10g, KH_2PO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.08g, yeast extract 0.5g, (Fe, Mo)citrate solution 20ml per liter, pH6.8, Kaneshiro and Kurtzman, 1982)와 GS 배지(KS 배지에서 yeast extract만을 제외)를 사용하였다.

Filter Mating between *E. coli* and *R. japonicum*.

R. japonicum R168 spc^r 는 PA배지에서 late exponential phase까지 배양하였고 donor인 *E. coli* WA803/pGS9은 kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, chloramphenicol 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함유한 LB배지에서 early log phase까지 배양한 후 mating에 사용

하였다. 각 cell들은 saline용액으로 세척한 후 적당한 비율로 섞어 PA배지위에 놓여진 milipore filter (0.45 μM) 위에서 28°C로 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 cell은 0.01% Tween 40을 함유하는 saline용액으로 현탁시킨 후 kanamycin과 spectinomycin를 각각 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유한 yeast extract-mannitol배지(Jordan, 1984)에서 transconjugant를 선별하였다.

Isolation of Total DNA from *R. japonicum*

R. japonicum R-168 $\text{spc}^r \text{km}^r$ 의 cell을 200 ml yeast extract-mannitol 배지에서 키운 후, harvest하여 lysis solution(guanidine isothiocyanate 5M, β -mercaptoethanol 8%, Tris, HCl 50mM, EDTA 10mM) 3ml에 현탁한 다음 25,000rpm에서 12시간 동안 CsCl density gradient ultracentrifugation 하였다. 얻어진 DNA band는 2배의 증류수로 희석하여 phenol extraction을 두번 행하여 ethanol precipitation하였다. 이때 형성된 DNA의 aggregate를 glass-rod로 감아올려 증류수에 용해하였다.

Subcloning of Tn5-Hind III Fragment

E. coli WA803/pGS9으로부터 pGS9을 분리한 후 Hind III로 절단하여 형성된 절편중 3.3Kb의 것을 분리하였으며 이 절편의 대량 분리를 위해 이것을 plasmid pUC9의 Hind III site에 insert시켜 *E. coli* HB 101에 transformation하여 subcloning하였다. 이 *E. coli* HB 101 km^r 균주들의 plasmid가 Tn5의 Hind III 절편을 함유하고 있음을 확인하고 이를 위에서 분리한 *Rhizobium*의 DNA에 대한 hybridization probe로 사용하였다.

Hybridization Procedure

R. japonicum R168 $\text{spc}^r \text{km}^r$ 의 total DNA를 EcoRI으로 digest한 후 agarose gel상에 전개하고 Southern blotting에 의해 nitrocellulose filter에 옮긴 후 nick translation에 의해 radioisotope로 label된 Tn5의 Hind III 절편을 probe로 하여 hybridization을 행하였다. 이에 따른 모든 과정은 기본적으로 Southern의 방법(Southern, 1975)을 변형시켜 사용하였다.

Inoculation test of *R. japonicum*

Conjugation에 의해 얻어진 *R. japonicum* R168 $\text{spc}^r \text{km}^r$ colony들을 각 항생제가 함유된

yeast extract-mannitol 배지에서 배양한 후 직접 콩(*Glycin max* L.)에 접종하여 4주간 생육시켜 근류형성 여부 및 질소고정력을 조사하였다.

Development of Free Living Nitrogenase Activity

Free living 조건에서 질소고정력을 유도시키기 위하여 Kaneshiro 방법(Kaneshiro and Kurtzman, 1982)을 다음과 같이 변형하여 사용하였다. 즉 cell을 stock cultures로부터 액체 KS 유도 배지에 접종하여 호기적으로 3일간 배양한 후 GS assay 배지 20ml가 들어있는 125ml의 serum vial의 agar 표면에 200 μ l씩 접종하였다. 다시 호기적으로 3일간 배양후 silicon rubber stopper로 밀봉하고 Argon으로 vial 내부의 공기를 치환하고 마지막으로 0.1 atm acetylene과 0.9 atm argon으로 치환하였다. 계속하여 7일간 배양후 생성되는 ethylene을 gas chromatography (Porapak R. column)를 사용하여 정량하였다.

결 과

Conjugal Transfer into *R. japonicum*

Tn5를 함유하고 있는 *E. coli* WA 803/pGS9

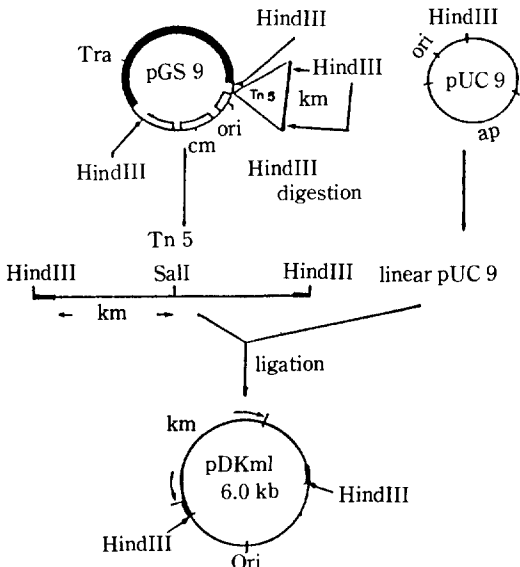


Fig. 1. Construction of plasmid pDKm1 containing Tn5-Hind III.

Conjugative plasmid pGS 9 was digested with HindIII and a 3.3 kb DNA fragment containing Tn5 DNA was isolated and ligated into HindIII site of pUC 9.

plasmid는 filter mating conjugation에 의해 *R. japonicum* R168 spc^r 균주로 전이 되었는데, transconjugant들의 생성 빈도는 kanamycin 50 μ g/ml, spectinomycin 100 μ g/ml의 조건에서 선발하였을 때 recipient 당 1×10^{-5} – 5×10^{-7} 범위이었다. 또 이때의 transconjugant들의 생성 빈도는 자연발생적으로 나타나는 kanamycin resistant mutant의 생성보다 약 50배 이상의 높은 값이었다.

한편 mating 시간을 3일에서 5일간 변화하여도 conjugation 빈도는 크게 증가하지 않았으며 donor와 recipient의 비율은 5:1일 때가 최적으로 나타났다. *R. japonicum*의 transconjugant들은 항생제를 함유한 yeast extract-mannitol 배지에서 8일 내지 10일 배양으로 colony가 형성되었다.

Subcloning of Tn5-Hind III Fragment

Tn5를 *Rhizobium*에 도입 시키기 위한 전단계로 Tn5를 함유한 vector pGS9으로부터 Tn5의 부분을 Hind III로 digest한 후 분리하여 Fig. 1에서와 같은 방법으로 subcloning 하였다. 그 결과 pGS9은 예상한 바와 같이 HindIII에 의해 4개의 절편으로 나뉘었으며 이중 3.3kb의 부분이 Tn5

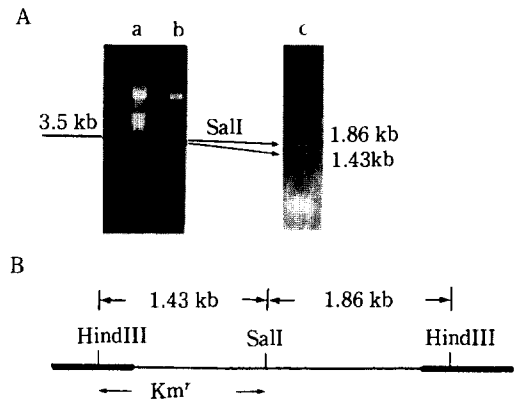


Fig. 2. Isolation of putative Tn5 DNA and cleavage map.

- A. pGS 9 containing Tn5 DNA was digested with HindIII and a 3.3 kb DNA fragment was isolated by gel elution. This fragment was cleaved into two fragments by SalI digestion.
- a: λ DNA digested with EcoRI
- b: pGS 9 DNA digested with HindIII
- c: putative Tn5 DNA digested with SalI
- B. Cleavage map of putative Tn5 DNA.

중 kanamycin 내성을 부여하는 sequence임을 Fig.2의 SalI digest에 의해 확인하였다(Fig. 2). 또한 이를 pUC9에 접합하고 *E. coli* HB101에 transformation 하여 재확인하였다(Fig. 3). 이 recombinant plasmid로부터 Tn5의 Hind III fragment를 다시 분리하여 앞에서 얻은 transconjugant들의 DNA의 hybridization 실험에 probe로 사용하였다.

Physical Characterization of Transconjugants

이상과 같은 방법으로 얻어진 transconjugant들의 특성을 조사하기 위하여, 항생제가 함유된 선별배지에서 생육이 양호한 colony 일부를 임의로 선택하여 total DNA를 분리한 후 EcoRI digest

를 Southern blotting을 통해 nitrocellulose filter에 transfer하고 Tn5의 Hind III 절편을 α -p³² ATP로 label 하여 hybridization을 행한 결과 각 transconjugant의 genome에서 Tn5와 의 sequence homology가 확인되었다(Fig. 4). 반면 *R. japonicum* R168 spc^r control (lane a)에서는 Tn5의 homologous band가 확인되지 않음으로써 Tn5가 *E. coli*로부터 *Rhizobium*으로 도입되었음을 확인하였다. 한편 51과 109의 lane에서는 강한 homology를 나타내는 3개의 band가 관찰되었는데 현재로서는 이러한 결과를 정확히 설명하기 어려우나 도입된 Tn5의 recombination에 의한 결과로 추측된다.

Phenotypic Characterization of Tn5 Mutants

이상의 hybridization의 결과는 Tn5가 *R. japonicum* 내에서 동일한 위치에 존재하지 않거나 recombination에 의해 한군데 이상의 위치에 도입되었을 가능성을 의미한다고 하겠다. 따라서 얻어진 mutant들의 Tn5에 의한 근류형성 및 질소고정력에 대한 표현형의 변화를 조사하였다. 얻어진 2000여개의 균주중 약 150여개의 균주를 임의로 선택하여 콩(*Glycin max* L.)에 접종하고 그로부터 4주 후 수확하여 질소고정력을 측정하여 본 결과(data not shown) 대부분의 균주가 control인 *R. japonicum* R168에 비해 낮은 질소고정력을 나타내었다. 이와 같은 결과는 Tn5가 *R. japonicum*의 질소고정에 관여하는 유전자에 직접 도입됨

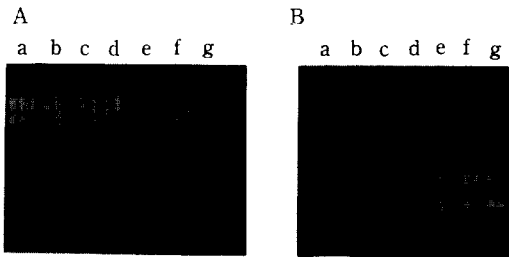


Fig. 3. Characterization of recombinant plasmid pDkm 1 from *E. coli* HB101 km'Ap' transformants.

- A. a-f : recombinant plasmids isolated from km'Ap' transformants.
- g : pUC 9 dimer DNA the bottom bond dimer form of pGC 9 DNA
- B. a : pUC 9 DNA digested with HindIII (2.7 kb)
- b-g: recombinant plasmids digested with HindIII.

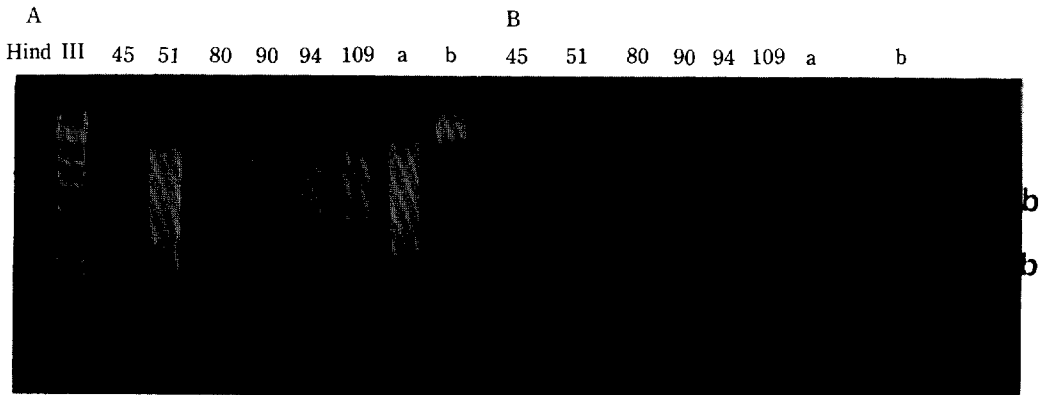


Fig. 4. Southern hybridization analysis of total DNA isolated from transconjugants.

- A. Eco RI digests of total DNA from serial number of transconjugants (45-109) and *R. japonicum* R-168 spc^r (lane a). Lane b shows the plasmid pGS 9 in *E. coli* WA 803.
- B. Hybridization pattern of corresponding lanes with Tn5-HindIII fragment labeled with isotropic ³²P.

로써 일어난 결과라기 보다는 일반대사에 관여하는 유전자에 Tn5가 도입되어 일어나는 비특이적인 간접현상으로 해석되었다 (Verma and Long, 1983). 한편 그중에서 질소고정에 관여하는 유전자에 직접 영향을 미친 것으로 생각되는 *R. japonicum* RMa75 균주를 선발하였는데 이 균주는 free living 조건과 (Fig. 5) 작물과의 공생조건에서 ARA를 측정한 결과 모두 질소고정력이 관찰되지 않았다. 또 이 균주에 의해 생성된 nodule을 절단하여 본 결과 leghemoglobin이 결핍되어 있는 것을 관찰하였다.

고 찰

Transposon Tn5의 *Rhizobium*으로의 도입을 통한 질소고정유전자의 'site specific mutagenesis' 방법이 Ausubel에 의해 소개된 후 (Ruvkun and Ausubel, 1981) Tn5를 *Rhizobium*으로 도입하기 위한 여러가지 방법이 시도되었으며 특히 *R. japonicum*에 대해서는 Hahn and Hennecke (1984)가 pSUP 101, pSUP 201을 사용하여 *R.*

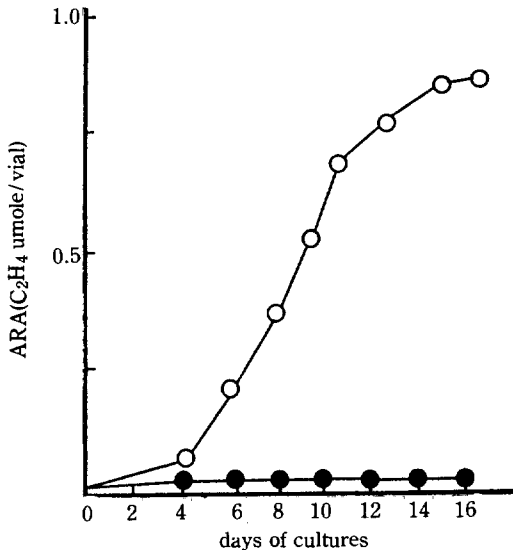


Fig. 5. Free living nitrogenase activity of *R. japonicum* R-168 spc⁺ and RMa75, a fix⁻, nod⁺ transconjugant isolated from Tn5 mutagenesis.
 ● - ● : ARA developed by *R. japonicum* RMa75, ○ - ○ : ARA developed by *R. japonicum* R-168 spc⁺

*japonicum*의 *nif* gene에 대한 Tn5의 site directed mutagenesis를 행하였다.

본 실험에 사용한 pGS9은 Iyer (Selvaraj and Iyer, 1983)에 의해 제조된 recombinant plasmid 로써 N group plasmid인 pCU1 (Konavaska and Iyer, 1981)의 transfer system과 *E. coli* plasmid인 p15A의 replication origin (Chang and Cohen, 1978)을 함유하여 *E. coli*와 *R. meliloti*간의 mating에 사용된 바 있다 (Selvaraj and Iyer, 1983). 본 실험에서는 같은 원리를 적용하여 *R. japonicum* 균주와의 mating을 실시하여 전술한 바와 같은 빈도의 transconjugant를 얻었으나 Iyer 등에 의해서 실시된 *R. meliloti*와의 mating에 비해서는 약 10배 이하의 낮은 빈도를 나타냈다.

한편 pGS9의 *R. japonicum*내에서 존재여부를 확인하기 위해 vector 부분에 의해서 발현되는 chloramphenicol의 내성을 조사해 본 결과 control wild type과 같이 sensitive 하였으며 plasmid도 확인되지 않음으로써 pGS9이 *R. japonicum*내에서 유지되고 있지 않음을 확인하였다. Tn5와 conjugant DNA와의 hybridization 결과 Tn5가 *Rhizobium*의 genome으로 incorporation 되었음을 확인하였는데 그 결과 hybridize된 extraband (Fig. 4)는 recombination에 의해 생긴 band로써 생각되며 크기가 작아지는 이유는 Tn5의 일부가 deletion 되어 생긴 것으로 보인다. Tn5 probe를 IS element, NPT II coding region, 나머지 loop region의 3부분으로 나누어 hybridize 하여 보았으나 3개의 probe에 모두 hybridize 하는 것으로 나타나서 (unpublished results) deletion된 정도가 아주 미세하고 본 실험에서 사용한 3종류의 probe에서 부분적인 deletion이 생긴 것으로 보인다. 이러한 사실을 명확히 밝히기 위해서는 extraband를 cloning 하여 sequence를 비교하여야 할 것이다. Tn5는 특이하게도 *R. japonicum*내에서 streptomycin에도 내성을 부여하는 것으로 알려져 있으며 (Rostas et al., 1984) selection plate에 kanamycin, spectinomycin 외에 streptomycin을 첨가했을 때 *R. japonicum* R168 spc⁺ control의 background colony 형성이 약 10배 정도 감소한 반면

transconjugant들은 streptomycin 125 mg/ml에 서도 생장이 저해되지 않았다.

이와 같이 확인된 conjugant들을 soybean에 접종했을 때 대부분은 정상적으로 근류를 형성하였으나 몇종의 균주는 근류형성이 극히 불량하였으며 이러한 균주들은 재접종을 통해 현재 그 표현형을 재차 확인중이다. 또한 nodule은 정상적으로 형성하나 질소고정력이 전혀 없는 *R. japonicum* RMa 75를 선발하였는데 이 균주에 의해 형성된 nodule은 leghemoglobin이 결핍되어 있는 것이 관찰되었다. 이상과 같은 결과는 일차적으로는 Tn5가 이 leghemoglobin 합성 pathway에 직접적인 영향을 미친 것으로도 생각할 수 있겠으나 *R. japonicum* RMa 75 균주를 free-living 상태

(leghemoglobin independent condition)에서 ARA를 측정하였을 때에도 역가가 나타나지 않은 것을 고려한다면, Tn5는 직접적으로 질소고정 관련 유전자에 영향을 미쳤고 그 결과 간접적으로 leghemoglobin 합성에 영향을 미친 것으로 생각되었다. 그러나 Tn5의 polar effect에 의한 현상일 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다.

위와 같은 결과들로 N type의 gene transfer system이 *E. coli*와 slow growing *R. japonicum* 간에도 이루어질 수 있음을 확인하였으며 이 조건을 이용한 Tn5의 *R. japonicum*에의 도입은 장차 site directed mutagenesis를 통한 slow growing *R. japonicum*의 질소고정 관련 유전자의 분리 확인에 필수적 과정으로 그 의의가 크다 하겠다.

적 요

Slow growing *R. japonicum* R-168 균주로부터 spectinomycin 내성 균주를 선발하고 이 *Rhizobium*내에 Tn5를 도입시키기 위하여 Tn5가 함유된 *E. coli* WA 803/pGS9과의 conjugation을 통한 transposon mutagenesis를 실시하였다. 이때 conjugation을 통한 Tn5 전이 빈도는 $1.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-7}$ 범위 이었으며, 얻어진 transconjugant들은 spectinomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)과 kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$)을 함유한 yeast extract-mannitol 배지에서 8-10일 배양후 colony를 형성하였다. 또한 transconjugant들은 genome상에 Tn5를 함유하고 있음을 hybridization을 통하여 확인하였다. 한편 nodule은 형성하나 질소고정 활성이 없는 돌연변이주 *R. japonicum* RMa 75 nod⁺fix⁻ 균주를 선발하였는데 이 균주는 nodule내에 leghemoglobin이 결핍되어 있음이 확인되었다.

REFERENCES

- Beringer, J.E., J.L. Beynon, A.V. Buchanan-Wollaston and A.W.B. Johnston, 1978. Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* **270**, 633-634.
- Beynon, J., M. Cannon, V. Buchanan-Wollaston and F. Cannon, 1983. The *nif* promoters of *K. pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* **34**, 665-671.
- Casadeus, J. and J. Olivares, 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **174**, 203-209.
- Chang, A.C.Y. and S.N. Cohen, 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Downie, J.A., G. Hombrecher, Q.S. Ma, C.D. Knight, B. Wells and W.B. Johnston, 1983. Cloned nodulation genes of *R. leguminosarum* determine host range specificity. *Mol. Gen. Genet.* **190**, 359-365.
- Fuller, F., P.W. Kunstner, T. Nanyen and D.P.S. Verma, 1983. Soybean nodulin genes: Analysis of cDNA clones reveals several major tissue specific sequences in nitrogen fixing nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 2594-2598.
- Hahn, M. and H. Hennecke, 1984. Localized mutagenesis in *R. japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **193**, 46-72.
- Hirsch, A.M., M. Bang and F.M. Ausubel, 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif*::Tn5 mutants

- of *R. meliloti*. *J. Bacteriol.* **155**, 367-380.
9. Jordan, D.C., 1984. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Gram negative aerobic rods and cocci. Vol 1, ed. by N.R. Krieg & J.G. Holt, William and Wilkins, Baltimore, pp234-254.
 10. Jorgensen F.A., S.J. Rothstein and W.S. Reznikoff, 1979. A Restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 65-72.
 11. Kaneshiro, T. and M.A. Kurtzman, 1982. Glutamate as a differential nitrogen source for characterization of acetylene-reducing *Rhizobium* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 201-207.
 12. Konavska Kozłowska, M. and V.N. Iyer, 1981. Physical and genetic organization of the incN-group plasmid pCU1. *Gene* **14**, 195-204.
 13. Merrick, M., M. Filser, R. Dixon, C. Elmerich, L. Sibold and J. Houmard, 1980. The use of translocable genetic element to construct a fine structure map of the *K. pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *J. Gen. Microbiol.* **117**, 509-520.
 14. Rostas, K., P.R. Sista, J. Stanley and D.P.S. Verma, 1984. Transposon mutagenesis of *R. japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **197**, 230-235.
 15. Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel, 1981. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* **289**, 85-88.
 16. Ruvkun, G.B., V. Sundaresan, and F.M. Ausubel, 1982. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *R. meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* **29**, 551-559.
 17. Scott, K.F., J.E. Hughes, P.M. Gresshoff, J.E. Beringer, B.G. Rolfe and J. Shine, 1982. Molecular cloning of *R. trifolii* genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 315-326.
 18. Selvaraj, G. and V.N. Iyer, 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *R. meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* **156**, 1592-1300.
 19. Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
 20. Verma, D.P.S. and S. L.ong, 1983. The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Internat'l Rev. Cytol. Suppl.* **14**, 211-245.

(Received Aug. 25, 1988)