

**Az ENOD12 korai nodulációs gén molekuláris genetikai jellemzése
Medicago növényekben**

Egyetemi doktori értekezés

Írta: Csanádi Gyula

MTA SZBK, Genetikai Intézet

Nitrogénkötési Csoport

Szakvezető: Dr. Kiss György Botond

A biológiai tudományok kandidátusa

Szeged, 1995.

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4.
1. BEVEZETÉS	5.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7.
2.1. A szimbiotikus folyamat leírása	7.
2.1.1. A preinfekció szakasza	7.
2.1.2. Az infekció és gümőkialakulás folyamata	9.
2.1.3. A gümő működésének kezdete	12.
2.2. A korai szimbiotikus folyamatokban szerepet játszó szignálok	12.
2.2.1. A növény szignálmolekulái	13.
2.2.1.1. A növényi flavon bioszintézis szerepe a szimbiotikus folyamatban	13.
2.3. A bakteriális gének szerepe a jelcserében	15.
2.3.1. A <i>NodD</i> fehérje szerepe	16.
2.3.2. A <i>Nod</i> faktor	17.
2.3.2.1. A <i>Nod</i> faktor hatása a növényre	18.
2.4. Szimbiózis-specifikusan kifejeződő növényi gének	18.
2.4.1. A gyökérszőr (RH) és a korai nodulin (ENOD) gének jellemzői	19.
2.4.2. A késői nodulinok	22.
2.5. Az ENOD12 korai gümőképzési gén jellemzése és feltételezett szerepe a <i>Rhizobium-Medicago</i> szimbiotikus kapcsolatban	24.
2.6. A genetikai megközelítés jelentősége a szimbiózisban szerepet játszó növényi gének vizsgálatában	26.
2.6.1. Növényi szimbiotikus mutánsok	27.
2.6.2. A genetikai térképezés jelentősége	29.
2.6. Az értekezés eredményeit megalapozó előzmények	30.
2.6.1. Mutáns izolálás diploid <i>Medicago</i> fajokból	30.
2.6.2. A lucerna genetikai térképének megszerkesztése	31.
3. CÉLKITŰZÉS	34.

4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35.
4.1.	Növényi anyag és a térképező populáció előállítása	35.
4.2.	Nodulációs teszt	35.
4.3.	DNS-technikák, hibridizáció	36.
4.4.	Genomikus DNS-szakaszok PCR-amplifikálása	37.
4.6.	A PCR-termékek klónozása és szekvenálása	38.
4.7.	Izoenzim analízis	38.
4.8.	A genetikai kapcsoltság számítása	38.
5.	EREDMÉNYEK	41.
5.1.	Az ENOD12 gének jellemzése <i>M. s. quasifalcata</i> k93 és <i>M. s. coerulea</i> w2 növényekben	41.
5.2.	AZ ENOD12 gének evolúciója	44.
5.3.	Az ENOD12 gének öröklődése az Mqk93 és az Mcw2 növények utódaiban: A null allél kimutatása	48.
5.4.	Az ENOD12 ^{q14} gén térképhelyzetének meghatározása	51.
5.5.	Az ENOD12 ^{w25} és az ENOD12 ^{w17} gének térképezése	52.
5.6.	Az OPD13/1 RAPD marker felhasználása a hárompontos térképezéshez	57.
5.7.	Az ENOD12 gén expressziója <i>M. s. quasifalcata</i> és <i>M. s. coerulea</i> növényekben A csak ENOD12 ^{w0} allélt hordozó növények gümőindukciója és gümőjük nitrogénfixáló képessége	65.
6.	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	66.
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	72.
8.	TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	74.
9.	IRODALOMJEGYZÉK	78.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkámat a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Nitrogénkötési Csoportjában végeztem. Köszönetemet fejezem ki az eredmények elérésében támogatást nyújtó összes munkatársam és barátom segítségét.

Köszönöm Dr. Alföldi Lajosnak, Intézetünk korábbi igazgatójának, hogy az Intézethez, és a kutatócsoporthoz történő csatlakozásomat lehetővé tette.

Köszönöm csoport- és témavezetőm, Dr. Kiss György Botond segítségét, irányítását, akitől szakmai tudásom legjavát tanultam, és aki biztosította munkámhoz az összes szükséges feltételt, valamint hasznos tanácsaival segítette e disszertáció elkészítését.

Köszönöm munkatársaim, Kaló Péter, Kiss Péter, Endre Gabriella, Felföldi Klára segítségét a munkám során felmerült problémák megoldásában.

Köszönetemet fejezem ki az ENOD12 gén vizsgálatában résztvevő kollégáim, Csiha Judit, Kondorosi Éva, Kondorosi Ádám, Ökrész László, Ráczkevy E. Anikó és Szécsi Judit részére, akiknek munkája komoly mértékben járult hozzá e dolgozat megszületéséhez.

Köszönöm asszisztensünk, Somkúti Pálné munkáját, aki a hibridációs kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítséget. Köszönöm Molnárné Bodó Klári, Liptai Zsuzsa, Tóth Lászlóné és Jenei Sándor asszisztenseink munkáját, a kísérletekhez használt növények gondozását.

Köszönöm munkatársamnak, Dr. Dusha Ilonának a dolgozat megírása során nyújtott segítségét, hasznos tanácsait.

Köszönöm Borka Andrásnak és Tóth Sándornénak az ábrák elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek azt a háttérrel, amely nélkül e dolgozat nem készülhetett volna el.

1. BEVEZETÉS

A nitrogén az élővilág számára nélkülözhetetlen elem. Alkotórésze az élő szervezetben található fehérjéknek, a fehérjéket kódoló nukleinsavaknak, valamint olyan fontos, biológiailag aktív molekulák felépítésében vesz részt, mint például a vitaminok és az intermedier anyagcsere számos molekulája. Az élőlények számára létfontosságú, hogy szervezetük nitrogénellátását a környezetükben található forrásokból folyamatosan biztosítsák.

A legjelentősebb nitrogénforrás a levegő, melynek körülbelül 78%-a nitrogén. E hatalmas készlet azonban a kémiaiilag rendkívül stabil, hármass kötésű dinitrogén molekula formájában van jelen, melyet az élőlények közül csak néhány mikroorganizmus képes közvetlenül hasznosítani. E mikrobák a légkörben található elemi nitrogént ammóniává redukálják, amit a növények be tudnak építeni a szervezetükbe, miáltal biztosítják a táplálkozási láncban utánuk következő állatvilág és az emberiség számára a nitrogénutánpótlást.

A nitrogénkötő mikroorganizmusok között található szabadon élők (pl. *Klebsiella*, *Azotobacter*), társulások vagy asszociatív (pl. *Azospirillum*, *Anabaena*), illetve szimbiózisban élők (pl. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*). E mikrobák közül a leghatékonyabban a gazdanövénygel szimbiózisban élők redukálják a nitrogént. A baktérium-növény kapcsolat kialakulása rendkívül specifikus, például a *Rhizobiaceae* család tagjai (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*) a *Leguminosae* növénycsalád megfelelő egyedeivel képesek nitrogénkötő szimbiózist létrehozni.

Az együttműködés kialakításában és működésében szerepet játszó genetikai elemek vizsgálatával a világ számos laboratóriumában foglalkoznak. E munka során mostanáig sikerült azonosítani a mikrobiális partner számos szimbiotikus génjét, és elkezdődtek a növényi partner géneinek megismerésére irányuló kutatások. E kutatások célja a lucerna növény és a *Rhizobium* baktériumok közötti szimbiotikus kapcsolatban résztvevő gének molekuláris szinten történő megismerése, melynek jelentősége mind

elméleti, mind gyakorlati szempontból igen nagy. E vizsgálati rendszer egyedülálló lehetőséget biztosít két, egymástól nagy evolúciós távolságra levő élőlény között kialakuló, molekuláris szinten megvalósuló kommunikáció vizsgálatára. A biológiai nitrogénkötés folyamatának megismerése segítséget nyújthat mezőgazdasági alkalmazásának hatékonyabbá tételében és széles körű alkalmazásában, ami a jövőben jelentősen csökkentheti az energia- és költségigényes, emellett környezetszennyező nitrogénműtrágyázás alkalmazását. A mostanra kiépített lucerna genetikai rendszer pedig a növény nemesítésének hatékonyabbá tételében játszhat komoly szerepet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szimbiotikus folyamat leírása

A szimbiotikus kapcsolat kialakulása összetett, több lépésből álló folyamat, melynek során a gazdanövény gyökerén kialakul egy speciális képződmény, a gyökérgümő. E különleges növényi szerv, mely otthont ad a nitrogénkötő baktériumoknak, a növény és a baktérium egymás kölcsönös felismerését követő kb. két héten belül jön létre. A nitrogénkötő gümő kialakulásának folyamata bakteriális és növényi gének együttműködésén, és a két egyed közötti folyamatos jelcserén alapszik (Kondorosi és mtsai 1991., Kondorosi 1992.).

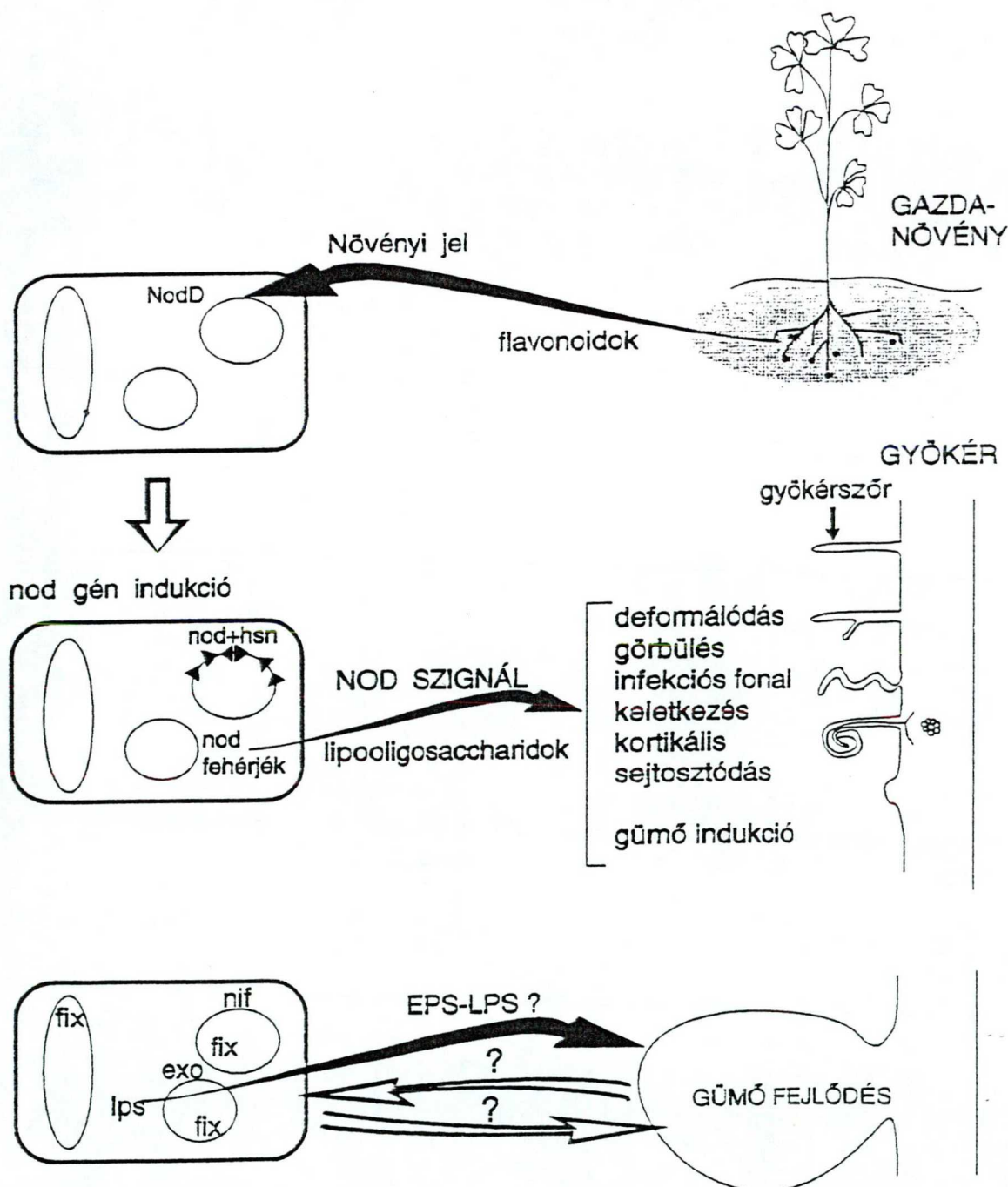
A trópusi eredetű pillangósok többségükben *determinált* gümőt képeznek, amelyre a sejtnagyobbodással járó növekedés jellemző, ellentétben a mérsékeltövi pillangósvirágúakkal, melyek folyamatosan osztódó, *indeterminált* gümőket alakítanak ki. Mivel a *Medicago* fajok ez utóbbi típusba tartoznak, a továbbiakban az indeterminált gümőtípus részletezésétől eltekintek.

A szimbiózis folyamatát fejlődésbiológiai szempontból négy fő szakaszra oszthatjuk. Az első szakasz az úgynevezett *preinfekció* időszaka, a második az *infekciós és gümőkialakulási* periódus, míg a harmadik szakasz a *gümő működésének* beindulását és fenntartását foglalja magában. Negyedik az *öregedési* időszak, melyet a szövetek előregedéséből származó szövetpusztulás jellemez.

2.1.1. A preinfekció szakasza

A *preinfekciós* időszakban a növény és a baktérium specifikus szignálok segítségével felismeri, "azonosítja" egymást, majd a bakteriális partner megkezdí a növénybe történő behatolását.

Eddigi tudásunk szerint a folyamatban szerepet játszó első szignál a növény által a talajba kiválasztott specifikus flavonoid molekula, mely a megfelelő baktérium kemotaktikus mozgását indukálja a gyökér irányába, valamint kiváltja a baktérium "válaszmolekulájának", a *Nod* faktornak a szintézisében szerepet játszó *nod* gének kifejeződését. Ez a szintén specifikus bakteriális szignál viszont a növényi partnerben indítja el a szimbiózissal kapcsolatos morfogenetikai változásokat (1. ábra).



1. ábra A *Rhizobium*-pillangósvirágú növény közötti kölcsönhatásokban szerepet játszó szignálok (Kondorosi és mtsai 1992.)

E molekula hatására egyes gyökérszőrök deformálódnak, meggörbülnek (Ward 1887., Bauer 1981.), miközben a gyökér meghatározott kéregsejtjeiben (inner cortex vagy belső kéreg) sejtosztódás kezdődik (Newcomb és mtsai 1979.).

Mikor a baktérium kemotaktikus vándorlása eredményeképp találkozik a növény gyökerével, a gyökérszőrökön megtapad, és e struktúrák végein *pásztorbot*-szerű görbületet indukál, amely végül teljesen magába zárja a mikrobát. Miként a szimbiózis kialakításának számos lépése, a megtapadás is szigorúan gazdaspecifikus, vagyis egy adott baktérium csak a neki megfelelő pillangósvirágú növény gyökérszőréhez képes kapcsolódni. A fizikai kontaktus során megnyilvánuló gazdaspecifitás biztosításában szerepe van a bakteriális membránfelszín egyes poliszacharid molekuláinak, valamint a növényi *lektin* fehérjéknek, melyek poliszacharid-kötő doménnel rendelkeznek (Dazzo és Hubbel 1975., Diaz és mtsai 1989.).

2.1.2. Az infekció és a gümőkialakulás folyamata

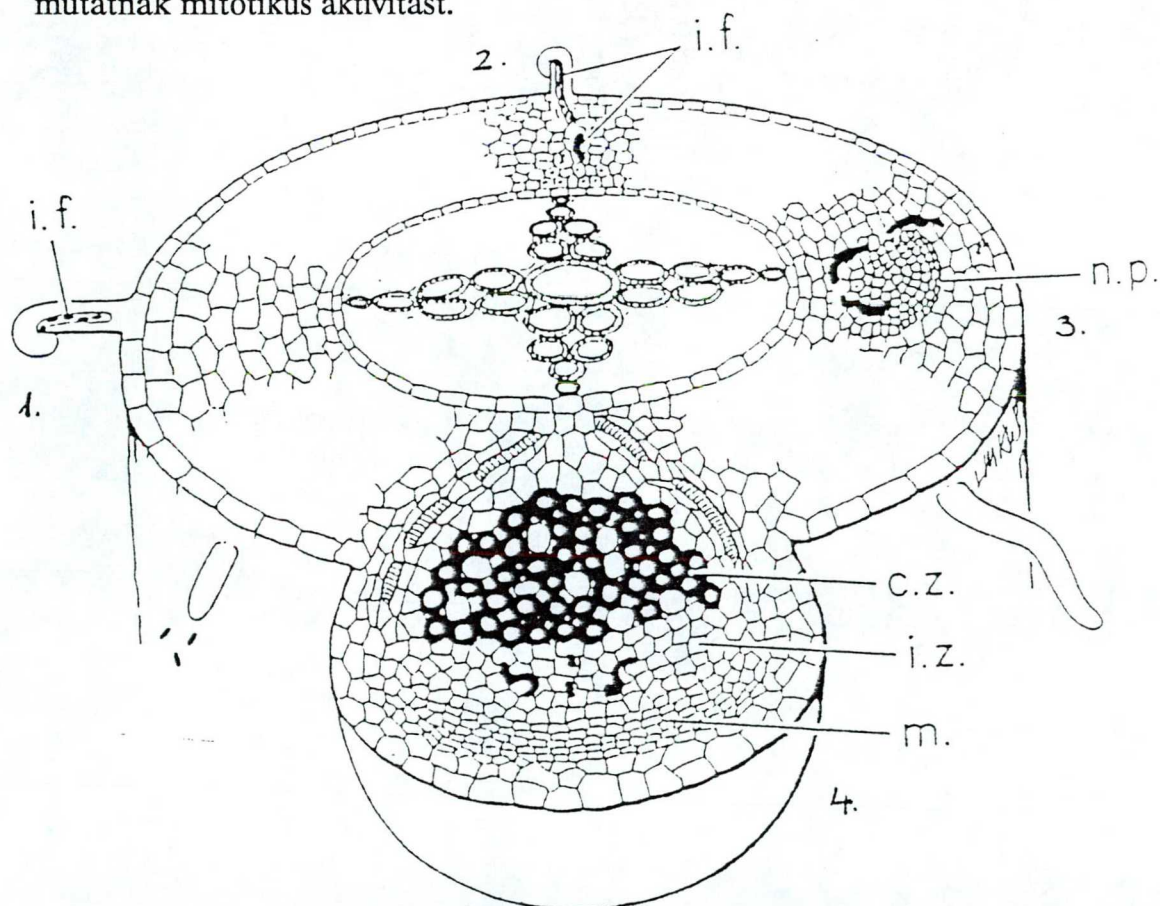
A szimbiózis második szakaszát két, egymástól jól elkülöníthető esemény, a baktériumok infekciója és a gümő szöveteinek kialakulása határozza meg. E két folyamat eredményeképp kialakul a szimbiotikus nitrogénkötésre alkalmas gyökérgümő.

A baktériumok inváziója a növényi sejtfal lokális hidrolízisével kezdődik (Newcomb 1979.). Ezt követően a baktériumok a növényi sejt plazmamembránjának betűródése révén bekerülnek a gyökérbe és ott sejtről sejtre vándorolnak a növény által kialakított, sejtfal jellegű csőben, az *infekciós fonál*ban (2. ábra). Vándorlásuk közben folyamatosan osztódnak, mialatt mukopoliszacharidokból álló mátrix alakul ki körülöttük (Kijne 1992.).

A sikeres infekcióban feltehetően nagy szerepe van a különböző bakteriális sejtfelszíni poliszacharidoknak. Ha a növény a szervezetébe került baktériumokat "idegennek", "ellenségnek" ismeri fel, azokat védekezőmechanizmusa segítségével

elpusztítja (Dixon és Lamb 1990., Vasse és mtsai 1993.). A *Rhizobiumok* számára tehát létfontosságú, hogy a növény felismerje: nem patogén mikrobák jutottak szervezetébe. Nagy valószínűséggel ebben az azonosítási folyamatban játszanak fontos szerepet a *Rhizobiumok* *exo*, *lps* és *ndv* génei által kódolt különböző sejtfelszíni poliszacharid molekulák, többek között az EPS-ek (exopoliszacharidok), az LPS-ek (lipopoliszacharidok) és a béta-glükánok, (Carlson és mtsai 1987., Gray és Rolfe 1990., Putnoky és mtsai 1990., Petrovics és mtsai 1993.).

A baktériumok vándorlásának célja a gyökér kérgében kialakuló *gümőkezdemény*, a *primordium* (2. ábra). A kéreg egyes differenciált sejtjei dedifferenciálódnak, és mitotikus osztódással létrehozzák először a *primordiumot*, majd az érett gümőre jellemző többi szövetet. A gazdanövény gümőtípusától függ, hogy mely kéregsejtek mutatnak mitotikus aktivitást.



2. ábra. A gümő kialakulásának főbb lépései és a kialakult gümő főbb szövetei lucernában. i.f. = infekciós fonal, ebben vándorolnak a baktériumok a primordiumhoz; n.p. = gümőkezdemény, primordium; c.z. = központi szövet, a szimbiózist végző bakteroidokat tartalmazza - korai és késői szimbiotikus zónára osztható; i.z. = inváziós zóna, itt történik a baktériumok bakteroiddá történő alakulása; m = merisztéma, állandóan osztódó szövet.

A fentebb már említett mérsékeltövi pillangósoknál (például a borsó, a here és a lucerna), melyek általában folyamatosan osztódó sejteket tartalmazó (*indeterminált*) gümőket képeznek, a sejtosztódás a belső kéregsejtekben kezdődik (Newcomb és mtsai 1979). E növényekben egy, a folyamatos mitotikus osztódás állapotában lévő szövet, az úgynevezett *gümőmerisztéma* létrehozza az e típusra jellemző ovális alakú gümő többi szövetét. Mivel a merisztémaszövet a gümő fejlődése során végig megmarad, a gümő folyamatos növekedését az állandó sejtosztódás biztosítja. Mikor a baktériumok elérik a *primordiumot*, növényi plazmamembránnal (*peribakteroid* membrán) körbevéve kijutnak az infekciós fonalból a növényi sejt belsejébe (Verma és mtsai 1978., Roth és mtsai 1988., Verma 1992.), és kialakítják a *bakteroidokat* (2. ábra).

Az érett gümő a *központi* és a *perifériás* szövetekből épül fel. A központi szövetben négy zónát tudunk megkülönböztetni. A gümő fejlődési fokozatainak megfelelően, az állandóan osztódó merisztématikus zóna mellett az *infekciós* zóna található, melyet a baktériumok *infekciós fonálból* a növényi sejtekbe történő kiszabadulása jellemez. Ezt követi a *korai szimbiotikus* zóna, ahol a kéregsejtekbe bejutott baktériumok addig osztódnak, míg a fertőzött sejteket teljesen megtöltik bakteroidokkal. A következő a *késői szimbiotikus*, vagy *nitrogénfixálási* zóna. Az itt elhelyezkedő fertőzött sejteket teljesen betöltik a *bakteroidok*: ez a zóna a nitrogénkötés helye. A pusztuló növényi és bakteriális sejteket tartalmazó *öregedési* zóna e gümőtípusban szintén megfigyelhető. A *perifériális* szöveteket alkotó struktúrák részei a gümőt kívülről határoló *gümőkéreg*, valamint a *szállítóyalábokat* tartalmazó *gümőparenchima*, melyeket a *gümő endodermisz* választ el egymástól.

A bakteroidokat tartalmazó funkcionális gümő kialakulásával lezárul a szimbiotikus nitrogénkötés kialakulásának második szakasza.

2.1.3. A gümő működésének kezdete

A harmadik szakaszt a gümő nitrogénkötési funkciójának beindulása jellemzi. Ennek során a kialakult gümőkben elhelyezkedő, *bakteroidokká* alakult *Rhizobiumok* a nitrogeáz enzimrendszer segítségével az elemi nitrogént ammóniává redukálják, mely a növény aminosavaiba épül be. A nitrogénasszimiláció szempontjából két fő csoportra oszthatjuk a pillangósvirágú növényeket. A trópusi eredetű pillangósok - ide tartozik többek között a szója - ureideket szintetizálnak és transzportálnak, míg a mérsékeltövi pillangósok (pl.: lucerna, borsó, here) pedig amidok formájában szállítják a megkötött nitrogént. A baktérium a nitrogénkötéshez szükséges energiaigényét nagyrészt a növény által biztosított szénhidrátokból fedezi.

2.2. A korai szimbiotikus folyamatokban szerepet játszó szignálok

Az előző fejezetben leírt folyamatokat irányító növény-baktérium kommunikációról számos összefoglaló közlemény jelent meg mostanáig (Kondorosi és mtsai 1989., Long 1989., Long és Atkinson 1990., Nap és Bisseling 1990., Kondorosi és mtsai 1991., Caetano-Anollés és Gresshoff 1991., Kondorosi és mtsai 1992., Kondorosi 1992., Fisher és Long 1992., Hirsch 1992., Clarke és mtsai 1992., Verma 1992., Kondorosi és mtsai 1993., Vijn és mtsai 1993.), mely mutatja e szignálcserekből álló folyamat kiemelkedő jelentőségét. Ennek főbb lépései az 1. ábrán láthatók. A kutatások elsősorban a *Nod* faktor szintézisében szerepet játszó bakteriális gének vizsgálatára összpontosultak, valamint annak megismerésére, hogy e faktor hogyan befolyásolja a növényi morfogenezist.



2.2.1. A növény szignálmolekulái

A partnerek közötti kommunikáció során a növénytől érkező flavonoid molekula jelként szolgál a baktérium számára, melynek abban szimbiotikus gének kifejeződését váltja ki (1. ábra).

A pillangósvirágú növények anyagcseréjük során a flavonoid típusú vegyületek széles skáláját állítják elő, melyek számos funkciót látnak el a növény szervezetében (Koes és mtsai 1994.). Ezek között vannak olyan flavonok, izoflavonok és flavanonok, melyeket a növény kiválaszt a talajba. E specifikus molekulák alacsony koncentrációban hatva (10^{-7} - 10^{-11} M) serkentik a *Rhizobiumok* kemotaktikus mozgását a növény irányába, valamint indukálják a baktérium gümőképzési (nodulációs, *nod*) génjeinek kifejeződését (Peters és mtsai 1986., Redmond és mtsai 1986., Zaat 1987., Györgypál és mtsai 1988., Peters és Verma 1990., Györgypál és mtsai 1991.). A bakteriális gének indukciója gazdaspecifikus, például a *Bradyrhizobium* fajok elsősorban izoflavonokkal, a *Rhizobium* fajok pedig flavonoidokkal indukálhatók. A pillangós fajok különböző összetételű flavonoid-keveréket bocsátanak ki, melyek között számos olyan is található, amely bizonyos *Rhizobium* fajokban gátolja a *nod* gének aktivitását (Firmin és mtsai 1986., Djordjevic és mtsai 1987., Peters és Long 1988.). Ez a kölcsönhatás szintén szerepet játszhat a szimbiotikus kapcsolat gazdaspecifitásának meghatározásában.

2.2.1.1. A növényi flavon bioszintézis szerepe a szimbiotikus folyamatban

A növények által szintetizált fenilpropanoid termékek mellett, hogy bakteriális szignálként működhetnek, számos funkciót látnak el a növény növekedése, fejlődése, valamint a növény-mikroba kölcsönhatások során (Hahlbrock és Scheel 1989., Dixon és Lamb 1990., Koes és mtsai 1994.). Fontos szerepük van a növényi védekezőmechanizmusban az antibiotikumként működő fitoalexinek révén, valamint a gümőképzést indukáló flavonoidok közreműködésével a szimbiotikus folyamat

kialakításának és fenntartásának nélkülözhetetlen elemei. Az egyes flavonoid termékek mennyiségének, arányának szabályozásában kulcsfontosságú szerepe van a növényi flavon bioszintézisben résztvevő enzimeknek, és az őket kódoló géneknek.

A flavonoidok termelésének két központi enzime a fenilalanin ammónia-liáz (PAL) és a salkon szintáz (CHS) (Smith és Banks 1986.). E két enzim termékei szubsztrátként résztvesznek a védekezőmechanizmusban szerepet játszó molekulák szintézisében éppúgy, mint a baktérium nodulációs génjeit indukáló flavonoidokéban. Az enzimeket a legtöbb növényben géncsaládok kódolják, melyek egyes tagjai különböző szignálok hatására aktiválódnak (Estabrook és mtsai 1991.). Ilyen szignál a *Rhizobiumok* (ezen belül is feltehetően a *Nod* faktor - erről később lesz szó) jelenléte, mely a CHS/PAL géncsalád szimbiózis-specifikus tagjainak expresszióját váltja ki (Estabrook és mtsai 1991.). Ennek eredményeképp megemelkedhet a flavonoidok mennyisége, valamint olyan flavon molekulák termelése indukálódhat *de novo*, melyek a baktérium megjelenése előtt nem voltak kimutathatók a növény környezetében (van Brussel és mtsai 1990., Recourt és mtsai 1992.). Mivel e vegyületek a bakteriális nodulációs génekre aktiváló hatásúak, feltételezhető, hogy e "második *burst*"-nek nevezett folyamat felelős a baktérium eme génjei aktivitásának fenntartásáért az infekció során (Koes és mtsai 1994.).

Az indukáló flavonoidok mennyiségének növekedését a CHS mRNS *in situ* hibridizációs vizsgálatával követték nyomon. Megállapították, hogy a megemelkedett CHS-expressziót mutató sejtek távol vannak a baktériumtól, így egy diffúzibilis molekula, minden bizonnyal a baktérium specifikus szignálmolekulája, a *Nod* faktor felelős a flavon-bioszintézis aktiválásáért (Yang és mtsai 1993.). Ezt támasztja alá az a kísérlet is, melyben a fenilpropanoid út egy másik enzimét, az izoflavon reduktázt (IFR) kódoló gént tudták *Nod* faktorról aktiválni sejt kultúrában (Savouré és mtsai 1994.).

A bakteriális szignál hatására meginduló kérgi sejtosztódás, valamint a gümő morfogenezis regulációjában nagy valószínűséggel szintén közreműködnek flavonoidok. A *Rhizobium* nodulációs génjeit indukáló flavonoidok között olyanok is találhatóak,

melyek a növény belső auxintranszport inhibitorai (ATI) (Jacobs és Rubery 1988.). Mivel külsőleg adott auxintranszport gátlókkal sikeresen indukáltak gümőszerű struktúrákat (Hirsch és mtsai 1989.), feltételezhető, hogy a növény belső ATI-szintje a gümő organogenezis szabályozásában fontos szerepet játszik, valószínűleg a belső hormonegyensúly megváltoztatásával. A növényi hormonok (elsősorban az auxin és a citokinin) bizonyítottan szerepet játszanak a sejtosztódás, és ezen keresztül a gümő organogenezis folyamatában (Miao és mtsai 1993., Kondorosi és mtsai 1993.). A jelenlegi elképzelések szerint a *Nod* faktor a flavonoid termelés indukciója révén megváltoztatja a hormonegyensúlyt a növényi gyökérben (pl. az auxin transzport gátlásával), minek következtében sejtosztódást indukál az adott helyen (Estabrook és Sengupta-Gopalan 1991., Verma 1992., Franssen és mtsai 1992., Hirsch 1992.).

A szimbiotikus kapcsolat későbbi folyamatainak szabályozásában szintén szerepet játszanak a flavon bioszintézis út elemei. A *Rhizobiumok* inváziója során számos baktérium elpusztul, és csak korlátozott számú infekció lesz sikeres. Kimutatták, hogy az ily módon elpusztult baktériumok környezetében a növény-patogén kölcsönhatás során a növényi védekezőmechanizmusra (Dixon és Lamb 1990.) jellemző fehérjék és fenilpropanoid termékek találhatóak (Vasse és mtsai 1993.). Emellett bizonyították azt is, hogy a működőképes gümő kialakítására képtelen, mutáns (Fix^-) baktériumok is képesek indukálni a növényi védekezőmechanizmusban szerepet játszó CHS expresszióját (Grosskopf és mtsai 1993.). Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a növény védekezőmechanizmusán keresztül *autoregulálja* a kialakuló gümők számát (Vasse és mtsai 1993.).

2.3. A bakteriális gének szerepe a jelcserében

A növénytől érkező szignál érzékelésében és a baktérium "válaszmolekulájának" elkészítésében a bakteriális *nod* gének által kódolt fehérjék vesznek részt. A folyamat során a baktérium *NodD* fehérjeje kölcsönhatásba lép a megfelelő növényi

flavonmolekulával, és ennek hatására indukálja a többi *nod* gén kifejeződését, amelyekről keletkező fehérjék elkészítik a baktérium szignál molekuláját, a *Nod* faktort (1. ábra). Az elkészített faktort a baktérium kiválasztja környezetébe, amely kölcsönhatásba lép a növény gyökerével, és abban a szimbiotikus kapcsolat kialakításához szükséges változásokat indukál. A bakteriális *nod* gének operonokba szerveződtek, és *R. meliloti* esetében az ún. szimbiotikus megaplazmid 100 kb-os szakaszán helyezkednek el (Bánfalvi és mtsai 1981., Kondorosi és mtsai 1991.). A *Rhizobium*ok nodulációs génjeit közös (Kondorosi és mtsai 1984.), gazdaspecifikus (Horváth és mtsai 1986.) és *nodD* génekre oszthatjuk (Györgypál és mtsai 1991.).

2.3.1. A *NodD* fehérje szerepe

A *nodD* gén terméke reguláló szerepet betöltő fehérje, melynek feladata a többi nodulációs gén szabályozása (Rossen és mtsai 1985., Spaink és mtsai 1987., Györgypál és mtsai 1988.). A *NodD* protein - *Rhizobium* fajok között nagyfokú változatosságot mutató - C-terminális vége felé eső aminosavak felelősek feltehetően a flavonoid-molekulával kialakított kölcsönhatásért, a konzerváltabb bázissorrendű N-terminális vég pedig a fehérje által regulált *nod* gének promóterében található specifikus régióhoz, a *nod*-boxhoz (Rostás és mtsai 1986.) való kötődést biztosítja. Mivel a protein ligandkötésért felelős C-terminális része fajok között nagy heterogenitást mutat, és mivel egy adott *NodD* molekula a nagy változatosságot mutató inducerek csak egy adott csoportjával képes kapcsolatba lépni, megállapítható, hogy a szimbiózis gazdaspecifitásának első szintjét a *NodD*-flavonoid kölcsönhatás jelenti.

2.3.2. A *Nod* faktor

A szimbiotikus szignálcserében résztvevő igen fontos molekula a baktérium által előállított *Nod* faktor. E molekula szintézisében a *NodD* által aktivált *nod* génekről keletkező fehérjék vesznek részt (Schultze és mtsai 1994.).

Elsőként a *R. meliloti* *Nod* faktorát izolálták és jellemezték (Lerouge és mtsai 1990.), amely egy telítetlen zsírsavval acilált glükózamin tetraszacharid, egy szulfát és három acetát csoporttal. Számos, növényi morfogenetikai szignálként működő, a növényi sejtfalból származó oligoszacharidot jellemezték mostanáig (Fry és mtsai 1993.), így nem meglepő, hogy e bakteriális szignál is oligoszacharid típusú molekula.

A *Rhizobium*-pillangósvirágú növény szimbiotikus kapcsolatának kialakítása során a gazdaspecifitás második szintjét az egyes fajok *Nod* faktorainak változatossága biztosítja. A gazdaspecifitás egyrészt a *Nod* faktorok szerkezeti változatosságán, másrészt az egyes fajok által kiválasztott faktorkeverék összetételén (milyen arányban tartalmaz aktív, inaktív vagy antagonistá faktort), harmadrészt pedig a szignálmolekula koncentrációjának változatosságán keresztül valósul meg (Schultze és mtsai 1994.)

Egy adott *Rhizobium* faj gazdanövényén a szignálmolekula biológiai aktivitását igen alacsony koncentrációban fejti ki (10^{-12} - 10^{-8} M) (Lerouge és mtsai 1990., Schultze és mtsai 1992.). Nagyobb töménységben adagolva azonban a faktor képes a baktérium számára nem gazdanövény pillangósvirágún is gyökérszőr deformációt kialakítani (Schultze és mtsai 1992.), illetve egyes korai növényi nodulációs géneket indukálni (Horváth és mtsai 1993.).

A faktor szerkezete elsősorban az egyes ligandumok révén befolyásolja a gazdaspecifitást. Ennek fő meghatározója *R. meliloti*-ban a lipooligoszacharid molekula redukáló végén elhelyezkedő szulfátcsoport (Roche és mtsai 1991.). A szulfatálásért felelős *nodH* gén mutációja ugyanis alapvetően megváltoztatja a *R. meliloti* gazdaspecifitását (Horváth és mtsai 1986.). Hasonló kísérletekkel sikerült igazolni a zsírsavláncnak a faktor specifitásban betöltött szerepét (Spaink és mtsai 1989.).

A *Nod* faktoriall végzett legújabb kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a faktor különböző változatai eltérő stabilitást mutatnak a növényi kitinázokkal való emésztéskor, aminek meghatározó szerepe lehet a gazdanövény számára megfelelő biológiai aktivitással rendelkező *Nod* faktor szelektálásában (Schultze és mtsai 1993., Staehelin és mtsai 1994.).

2.3.2.1. A *Nod* faktor hatása a növényre

A növényi partnerben a *Nod* faktor hatására megindul a gümőképződés, valamint a felkészülés a baktériumok fogadására. E két folyamatnak több összetevője van. A tisztított szignálra adott leggyorsabb növényi válasz a gyökérszőrök membrádepolarizációja (Ehrhardt és mtsai 1992), melynek jelentősége még nem ismert. Az első mikroszkóppal is megfigyelhető növényi reakció a gyökérszőrök deformációja, görbülése, melynek során a gyökérszőrök mintegy 25%-a pásztorbot-szerű struktúrát formál, mely a baktériumok behatolását előzi meg (Kijne 1992.). Ezzel párhuzamosan a gyökér kérgi sejtjeiben sejtosztódást indukál a *Nod*-faktor, valamint kimutatható egyes flavonoidok termelésének megnövekedése is (van Brussel és mtsai 1990.).

A gümőkialakulás és a bakteriális invázió megkezdődésekor szimbiózis-specifikusan megnyilvánuló növényi gének indukálódnak.

2.4. Szimbiózis-specifikusan kifejeződő növényi gének

A nitrogénkötésre képes növények azon fehérjéit, melyek megtalálhatók a gümőben, a gyökérszövetben azonban nem, nodulin fehérjéknek nevezzük (Legocki és Verma 1980.). Ezek között találhatunk olyanokat, melyek funkciója már ismert (leghemoglobin, urikáz stb.) (Brisson és Verma 1982, Bergmann és mtsai 1983), illetve olyanokat, melyek szimbiózisban játszott szerepe még ismeretlen (Nodulin-22, Nodulin-

25, Nodulin-26 stb) (Verma és mtsai 1986, Kiss és mtsai 1990., Fortin és mtsai 1987). A nodulinokról feltételezik, hogy szükségesek a gümőfejlődéshez és a hatékony nitrogénkötéshez. A nodulin fehérjék génjeit nodulin géneknek nevezzük (van Kammen 1984.), melyek a gümőszövetben fejeződnek ki. Megjelenésük időbeli - és gyakran térbeli - elkülönülése alapján korai (ENOD), és késői (NOD) génekre oszthatjuk őket. A preinfekció során megnyilvánuló géneket RH (root hair) géneknek nevezzük, melyek nem minősülnek valódi nodulin géneknek. A korai (ENOD) gének a nitrogénfixálás bekapcsolása előtt fejeződnek ki, az ezt követően expresszálokat hívjuk késői nodulin géneknek (NOD). Az egyes csoportok génjeinek expressziója természetesen nem határolódik el mereven egymástól, mivel egyes korai nodulációs gének (ENOD12, ENOD5) expresszálnak gyökérsejtekben is (Gloude-mans és mtsai 1989.), az ENOD12 gén kifejeződése pedig már néhány órával az indukció után kimutatható (Pichon és mtsai 1992.). A növényi nitrogénasszimilációban résztvevő enzimek között pedig számos olyan található (aszpartát aminotranszferáz v. AAT, foszfoenol piruvát karboxiláz v. PEPC, glutamát szintáz v. GOGAT stb.), melynek génje kifejeződik a növény egyéb szöveteiben is, azonban gümőben az expresszió szintje többszörösére is növekedhet (Vance és mtsai 1994.)

2.4.1. A gyökérszőr (RH) és a korai nodulin (ENOD) gének jellemzői

Az RH gének vizsgálatát borsóban végezték el (Gloude-mans és mtsai 1989.). Az eddig jellemzett két RH gén közül az RH44 kifejeződik fertőzetlen gyökérsejtekben is, *Rhizobium* fertőzés hatására pedig megnő az expressziója. Az RH42 gén csak a bakteriális indukció hatására nyilvánul meg a gyökérben.

Az ENOD gének expressziós mintázata jó egyezést mutat az *indeterminált* gümőtípusra jellemző fejlődési zónákkal (Franssen és mtsai 1992.). Az ENOD gének megjelenése az egyes zónákban kapcsolatba hozható a gümőkialakulás két fő folyamatával, a *bakteriális infekcióval*, és a *gümő organogenezissel* (Scheres és mtsai

1990a., Nap és Bisseling 1990., Sanchez és mtsai 1991, Franssen és mtsai 1992., Horváth és mtsai 1993.). E folyamatok során történő megjelenésük alapján csoportosíthatjuk a korai nodulációs géneket.

Az *infekciós folyamathoz* két korai nodulációs gén, az ENOD5 és az ENOD12, expressziója kapcsolódik (Scheres és mtsai 1990a., 1990b.). E két gént először borsó cDNS génkönyvtárból izolálták. Bár az általuk meghatározott fehérjéket mostanáig nem sikerült kimutatni, a DNS szekvenciaadatokból az következik, hogy mindkét gén prolingazdag fehérjét kódol. Az ilyen típusú fehérjék egyik jellemzője, hogy a növényi sejt falban fordulnak elő (Scheres és mtsai 1990a, 1990b.). Az ENOD5 feltételezett fehérjeterméke ezen belül az arabinogalaktán proteinek (AGP) családjába tartozik, ami arra utal, hogy a fehérje az infekciós fonál mátrixában, illetve a peribakteriális térben van jelen. Ezen adatok, illetve azon a tény alapján, hogy az infekciós fonál fala a növényi sejt falhoz nagyon hasonló, azt gondolják, hogy e génnek szerepe lehet mind az infekciós fonál növekedésében, mind pedig a baktériumok proliferációjában (Scheres és mtsai 1990b., Rae és mtsai 1992.). Megállapították, hogy bár az infekciós zónában alacsony szinten kifejeződik, a gén expressziójának maximumát a korai szimbiotikus zónában éri el, és expressziója a fertőzött, infekciós fonalat tartalmazó sejtekre korlátozódik (Scheres és mtsai 1990b.) Az ENOD12 génnel kapcsolatos további ismeretek a következő fejezetben találhatóak.

A *gümő organogenezis* során megnyilvánuló korai nodulin gének a gümő különböző szöveteiben történő kifejeződésük alapján csoportosíthatók.

Az organogenezis beindulását jelző, mitotikusan osztódó *primordium* sejtekben már kimutatható ENOD gének expressziója (Scheres és mtsai 1990b.). Ezek közé tartozik az ENOD12 (Scheres és mtsai 1990a., Pichon és mtsai 1992.), a szója, a borsó és a lucerna ENOD40 (Yang és mtsai 1993., Kouchi és Hata 1993., Hirsch és mtsai 1993., Crespi és mtsai 1994.), valamint a szója GmENOD93 (Kouchi és Hata 1993.) nevű génje. Az ENOD40 géncsalád tagjai egyetlen mostanáig megismert DNS szekvenciával sem mutatnak homológiát. Jellemzőjük, hogy a 0.7 kb-os transzkriptumuk nem tartalmaz AUG kodonnal kezdődő nyitott leolvasási keretet. Ez arra utal, hogy az

ENOD40 valószínűleg nem fehérje, hanem RNS formában működik. Legújabb eredmények azt mutatják, hogy az ENOD40 a nem transzlálódó, a növényi fejlődési folyamatokat szabályozó RNS-ek új osztályát képviseli (Crespi és mtsai 1994.). A gén az osztódó kérgi sejtek mellett a *perifériális szövetekben* is megnyilvánul, azonban, míg a primordiumban történő expresszióhoz nem szükséges a baktériumok inváziója, addig a gümő szállítónyalábban történő kifejeződés a baktériumok jelenlététől függ (Yang és mtsai 1993., Franssen és mtsai 1993.). Ez azt jelentheti, hogy az ENOD40 gén egyes szövettípusokban történő megjelenését különböző mechanizmusok szabályozzák (Schultze és mtsai 1994.). A *perifériális szövetekben* megnyilvánuló ENOD40 gén funkciójával kapcsolatos másik feltételezés, hogy a génnek valamely transzport funkcióban lehet szerepe (Yang és mtsai 1993., Kouchi és Hata 1993., Yang és mtsai 1994.).

A GmENOD93 gén transzkriptumai először az osztódó kérgi sejtekből mutathatók ki, majd a gümő növekedésével párhuzamosan először a *merisztémában*, majd érett gümők fertőzött sejtjeiben található (Kouchi és Hata 1993.). A legutóbbi időben sikerült egy olyan gént is azonosítani, amelynek expressziója *gümőmerisztémában* a legnagyobb. Ez a *Medicago truncatula* MtPRP4 nevű génje, amely pentapeptid ismétlődő alegységekből álló prolingazdag fehérjét kódol (Wilson és mtsai 1994.).

A gümőmerisztéma mellett elhelyezkedő *infekciós zónában* fejeződik ki (az ENOD5 és ENOD12 gének mellett) a *M. sativa* ENOD10 génje, amely nagyfokú homológiát mutat a feltételezett ENOD12 fehérje N-terminális szignálpeptid részével (Löbner és Hirsch 1993.). Az ENOD10 expresszióját Northern-blot analízissel az inokulációt követő 6-8. napon ki lehet mutatni. E zóna proximális részében már kimutatható olyan korai nodulin gének expressziója, melyek maximumukat a következő, a korai *szimbiotikus zónában* érik el (Scheres és mtsai 1990b.). A ENOD5 kifejeződése a zóna fiatalabb, disztális sejtjeiben a legerősebb, míg a ENOD3 és ENOD14 géneké a korai szimbiotikus régió idősebb sejtjeit tartalmazó, proximális részén (Scheres és mtsai 1990b.), és alacsony koncentrációban a késői nitrogénkötési zónában is kimutathatók (Yang és mtsai 1994.). E két utóbbi gén ugyanannak a géncsaládnak a tagja, nagyfokú

homológiát mutatnak (65 %), és hasonlóan expresszálódnak. A ENOD3 és ENOD14 gének által kódolt fehérjék egy feltételezett szignálpeptidet tartalmaznak, mely membránon való átjutásukat valószínűsíti. Emellett található bennük négy ciszteint tartalmazó polipeptid régió, olyan elrendezésben, amely a fémion kötő fehérjéket jellemzi. Mivel a bakteroidok a nitrogén szintéziséhez nagymennyiségű molibdént és vasat igényelnek, feltételezik, hogy e fehérjék a vas és molibdén ionok peribakteroid membránon keresztül történő szállításában működnek közre (Scheres és mtsai 1990b.).

A korai nodulációs gének közül mostanáig mindössze kettőnek az expresszióját mutatták ki *perifériális szövetekből*: az ENOD40 és az ENOD2 génekét (Yang és mtsai 1994.). A korábban már ismertetett ENOD40 a primordium sejtek mellett a gümő szállítónyaláb primordiummal szemben fekvő periciklusos sejtjeiben is kifejeződik.

A másik korai nodulációs gént, az elsőként izolált ENOD2-t (Franssen és mtsai 1987., van de Wiel 1990b.) először borsó génbankból azonosították, majd ezt követően számos más pillangósból is klónozták homológjait. Jellemző, hogy prolingazdag ismétlődő pentapeptid szekvenciákat tartalmazó fehérjét kódol, melynek N-terminális végén egy feltételezett szignálpeptid van. Szekvenciája alapján a fehérje szintén a prolingazdag növényi sejtfehérjékkel mutat rokonságot. Expresszióját vizsgálva kiderült, hogy mindkét gümőtípusban a *gümőparenchimában* fejeződik ki (van de Wiel és mtsai 1990a, 1990b). Megállapították, hogy a baktérium jelenléte nem szükséges a gén kifejeződéséhez, ugyanis auxin transzport inhibitorokkal indukált (Hirsch és mtsai 1989, van de Wiel és mtsai 1990a.), illetve baktériummentes spontán gümőkben is megjelenik az mRNS-e (Truchet és mtsai 1989.) Ez egyrészt azt jelentette, hogy a gén feltételezhetően nem az infekciós folyamatban vesz részt, másfelől pedig jó markergénnek bizonyult a gümőfejlődési folyamat tanulmányozásához (Hirsch és mtsai 1989.). Az újabb vizsgálatok során sikerült olyan cisz-reguláló elemeket azonosítani a gén promoterében, melyek résztvesznek a génexpresszió szabályozásában (Lauridsen és mtsai 1993.). Az expressziós és az in situ hibridizációs adatok alapján azt gondolják, hogy a gümő belsejében meglévő mikroaerob környezet fenntartásához járul hozzá

oly módon, hogy résztvesz a gümőparenchima sejtjeinek oxigén-gát képzésében (Franssen és mtsai 1992.).

2.4.2. A késői nodulinok

Az érett gümő kialakulásával párhuzamosan jelennek meg a késői nodulinok, Elsősorban a késői szimbiotikus zónában nyilvánulnak meg, és a nitrogénkötéshez, valamint az ammónia asszimilációhoz szükséges feltételeket biztosító biokémiai folyamatokban vesznek részt.

A késői nodulinok közül legrészletesebben a leghemoglobint (**leguminous hemoglobin, lb**) analizálták. A gümő oldható fehérjéinek akár 25 %-át is kitevő leghemoglobin fehérjét számos pillangósvirágú növényből tisztították, és funkcióját vizsgálták. Az emlős hemoglobinokhoz hasonlóan az *lb* is nagy oxigén affinitással rendelkezik. E fehérje szerepe a gümő szabad oxigénkoncentrációjának szabályozása (Appleby 1984.), ami elengedhetetlen a nitrogénáz enzimszisztéma hatékony működéséhez. Megállapították, hogy a legtöbb pillangósvirágúban a leghemoglobint géncsaládok kódolják (Marcker és mtsai 1984.). Csoportunk munkatársai a lucerna *lbIII* cDNS-klónját azonosították (Kiss és mtsai 1987.), és a megállapított nukleotidsorrend alapján más *Medicago* leghemoglobin szekvenciákkal összehasonlították (Davidowitz és mtsai 1991.). Az eddig izolált leghemoglobin gének lehetővé tették e gének promoterében található különböző *cis* reguláló elemek kimutatását (Stougaard és mtsai 1990.), illetve e promotorszakaszok funkcionális analízisét (Szabados és mtsai 1990.). A lucerna genetikai térképének elkészítése során csoportunk az *lb* géncsalád három tagjának meghatározta a térképhelyét (Kiss és mtsai 1993, Kaló személyes közlés 1993. 3. ábra).

Az ammónia asszimilációban és a szénmetabolizmusban résztvevő késői nodulinok által katalizált funkcióra a növény többi részében is szükség van. Legtöbbjüknek azonban van gümőspecifikus, vagy gümőben megnövekedett expressziót mutató

formája. Az ammónia asszimiláció enzimeit közül a glutamin szintetáz (GS) és a glutamát szintáz (GOGAT) aktivitásának növekedését mutatták ki a nitrogénáz aktivitásának növekedésével összhangban. A GS egyik típusának génje gümőspecifikusan expresszál (GS-n), a másik csoportba tartozók aktivitása a szimbiózis során jelentősen megnövekszik (Forde és Cullimore 1989.). Eddigi adatok alapján e gének expressziójának szabályozásában a szén/nitrogén arány játszik szerepet (Sanchez és mtsai 1991.). Lucernában úgy tűnik, a GS géncsalád három tagból áll (GSa, GSb, GS_c) genetikai térképezés alapján (Kiss és mtsai 1993., Kaló személyes közlés 1993. 3. ábra). A GOGAT aktivitásának maximális szinten történő fenntartásához a szimbiotikusan kötött nitrogén jelenléte szükséges (Egli és mtsai 1989.). A nitrogéntranszporterek szintézisében játszik szerepet az urikáz II (nodulin-35) és aszpartát aminotranszferáz (AAT). Az urikázról kimutatták, hogy determinált gümőben az oxigénkoncentráció regulálja (Larsen és mtsai 1986.), a lucerna AAT-2-ben pedig olyan cisz reguláló elemeket mutattak ki, melyek néhány gümőspecifikus gén promoterében (Lb, N23) is megtalálhatók (Vance és mtsai 1994.).

A szénmetabolizmusban résztvevő két késői nodulinról, a foszfoenol piruvát karboxilázról (PEP karboxiláz) (Deroche és Carrayol 1989.) és a szacharóz szintázról (SS) (Thummler és Verma 1986.) is kimutatták, hogy van gümőspecifikusan megjelenő változatuk.

A peribakteroid membrán (PBM) nodulinok a baktérium növényi sejtbe kerülésekor kialakuló peribakteroid membránban találhatóak, és szerepük a bakteroidok kialakulásában lehet (Verma 1992.). Legalább két fehérje, a nodulin-24 és a nodulin-26 tartozik ebbe a csoportba, melyeket szójában azonosítottak (Fortin és mtsai 1985.). Bár e nodulinokkal számos vizsgálatot végeztek, funkciójukról csak feltételezések vannak (Verma 1992.).

Számos késői nodulin funkciója még ismeretlen. Ezek közül soknak a génjét már azonosították, többet közülük molekuláris szinten jellemezték. E csoportba tartozik többek között a nodulin-22, a nodulin-45 és a csoportunk munkatársai által azonosított

nodulin-25 is (Verma és mtsai 1986., Dunn és mtsai 1988., Szczyglowski és mtsai 1989., Kiss és mtsai 1990., Végh és mtsai 1990.).

2.5. Az ENOD12 korai gümőképzési gén jellemzése és feltételezett szerepe a Rhizobium- Medicago szimbiotikus kapcsolatban.

A gümőfejlődés során megnyilvánuló korai nodulin gének közül mostanáig legalaposabban az ENOD12-t tanulmányozták (Scheres és mtsai 1990a., 1990b., 1992., Govers és mtsai 1991., Pichon és mtsai 1992., Allison és mtsai 1993., Horváth és mtsai 1993., Bauer és mtsai 1994., Journet és mtsai 1994., Csanádi és mtsai 1994.). Ez a gén a korai szimbiotikus folyamatokban feltételezett központi szerepe miatt számos kutató érdeklődésének középpontjába került, "slágergénnek" számított a korai nodulációs gének között. A fokozott érdeklődés egyik oka, hogy az ENOD12 gén az infekció során nemcsak a baktériumot tartalmazó sejtekben, hanem a baktériumok fogadásához szükséges infekciós fonal elkészítésére felkészülő sejtekben is kifejeződik (Scheres és mtsai 1990a.). Emellett a gümőprimordium osztódó sejtjeiben is kimutatható, így feltételezhető volt, hogy a génnek sokoldalú szerepe van az infekciós folyamatban (Scheres és mtsai 1990a.).

Az ENOD12 gént először borsóban azonosították gümőspecifikus cDNS könyvtár differenciál hibridizációjával (Scheres és mtsai 1990a.). A gén a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* baktériummal történő infekció során aktiválódik, közvetlenül az infekciós fonal kéregsejtekbe történő behatolásával párhuzamosan. Az ENOD12 expressziója a gümőfejlődés során végig fennmarad, és a transzkriptumok az *indeterminált* gümők inváziós zónájában lokalizálhatók. A gén nemcsak a gümőben, hanem szárban és virágban is megnyilvánul (Scheres és mtsai 1990a.). Borsóban két gént, az ENOD12A-t és az ENOD12B-t mutatták ki, melyek hasonló módon regulálódnak (Govers és mtsai 1991.). Az ENOD12 génnel homológ DNS szekvenciákat *Medicago* fajokban is azonosítottak (Pichon és mtsai 1992., Allison és

mtsai 1993.). A borsóhoz hasonlóan a tetraploid *M. sativa* ssp *sativa* cv Nagyszénási két különböző gént tartalmaz, míg a diploid *M. truncatula* cv Jemalongban csak egyféle ENOD12 gént lehetett kimutatni (Pichon és mtsai 1992.). A szerkezeti és expressziós vizsgálatokból azt a következtetést lehetett levonni, hogy az ENOD12 gén ugyanazokban a szövetekben fejeződik ki lucernában és borsóban, és feltehetően hasonló szerepet tölt be mindkét növényben (Allison és mtsai 1993.).

A felismerés, hogy az ENOD12 az infekciós fonalat nem tartalmazó sejtekben is kifejeződik, azt jelzi, hogy a gén expresszióját valamely diffúzibilis szignálmolekula váltja ki. Azt már korábban bebizonyították, hogy a vad típusú *R. l. viciae* -ből készült sejtmentes kivonat képes kiváltani a gén expresszióját, míg ugyanez a hatás a nodulációban hibás mutáns baktérium extraktumával nem érhető el (Scheres és mtsai 1990a.). Azóta azonosították a *Nod* faktort, amellyel elvégzett kísérletekben bizonyították, hogy lucernában csak az ENOD12B gén expresszióját váltja ki, tehát az ENOD12A és ENOD12B gének regulációja eltér egymástól (Bauer és mtsai 1994.), ellentétben a borsóban tapasztaltakkal (Govers és mtsai 1991.).

Az intront nem tartalmazó ENOD12 gén egy olyan feltételezett fehérjét kódol, mely az N-terminális végén tartalmaz egy szignál peptid jellegű hidrofób régiót, míg a többi része két, ismétlődő pentapeptid egységből épül fel (Scheres és mtsai 1990a.). Ezen sajátságok alapján azt feltételezték, hogy az ENOD12 a hydroxiprolin-gazdag glikoproteinek (HRGP) (Schowalter 1993.) családjába tartozik, és az infekciós folyamat során az új sejtfa szintézisében vehet részt (Scheres és mtsai 1990a., Govers és mtsai 1991.). Bár a feltételezett ENOD12 protein jelenlétét mostanáig nem sikerült bizonyítani, valószínűnek látszik, hogy az nem vesz részt a növényi védekezőmechanizmusban (Scheres és mtsai 1990a.).

A fentebb említett munkákban egyértelműen bizonyították, hogy az ENOD12 kifejeződik a gümőfejlődés során. Arra azonban nem szolgáltatott bizonyítékot, hogy az ENOD12 génnnek van-e funkciója, és ha van, ez a funkció elengedhetetlenül szükséges-e a gümőfejlődéshez vagy a hatékony nitrogénkötéshez. E kérdés legmegfelelőbb bizonyítási módja az ENOD12 génben mutáns növények előállítása,

illetve természetesen előforduló mutáns növények azonosítása és funkcionális vizsgálata. E feladat nehézségét bizonyítja az a tény, hogy mostanáig egyetlen nodulációs génre sem sikerült mutánst izolálni, valamint egyetlen szimbiotikus funkcióban hibás mutáns növény génjét sem sikerült azonosítani.

2.6. A genetikai megközelítés jelentősége a szimbiózisban szerepet játszó növényi gének vizsgálatában

Egy adott biológiai folyamat megismerését nagymértékben elősegíthetjük a folyamat valamely lépéséhez szükséges gén(ek)ben hibás mutánsok izolálásával és azok jellemzésével. A hibás gént hordozó egyed vizsgálatakor biztosak lehetünk abban, hogy a kérdéses gén nélkülözhetetlen szerepet játszik az adott folyamatban.

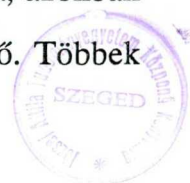
A genetikai módszereken alapuló, mutáns izolálási és komplementálási eljárás - a biokémiai megközelítéssel összehasonlítva - a növényi genom nagy mérete miatt azonban nehezebb, hosszú időt és sok fáradságot igénylő munka. Gyorsabban érhetőek el eredmények a másik módszer, a cDNS génbankok differenciál- illetve szubtraktív hibridizálásán alapuló biokémiai megközelítés alkalmazásával. Ennek során *Rhizobium*mal fertőzött (vagy *Nod* faktorról indukált) növényekből készített cDNS génkönyvtárból izolálják azokat a klónokat, melyek nem találhatók meg az indukálatlan kontroll növényekből készített cDNS géntárban. A világ számos laboratóriumában írtak le ezzel a módszerrel izolált korai és késői nodulin géneket, melyek közül csoportunk munkatársai a nodulin-25 késői nodulációs gént klónozták és jellemezték (Kiss és mtsai 1990.). Az előző fejezetekben említett korai nodulációs géneket is ezzel a módszerrel izolálták. Az ily módon klónozott génekről azonban csak annyit tudunk, hogy a szimbiózis során kifejeződnek, arról azonban, hogy van-e valamilyen funkciójuk a szimbiotikus folyamatban, csak feltételezésekkel rendelkezünk. A feltételezések szekvenenciaanalízisen és *in situ* hibridizációs adatokon alapulnak, melyek alapján e

kérdést nem lehet megválaszolni. A probléma megoldásához elengedhetetlen a mutációt szenvedett gének azonosításán alapuló vizsgálat.

2.6.1. Növényi szimbiotikus mutánsok

A szimbiotikus nitrogénkötési funkciójukban hibás növényi egyedek izolálása történhet indukált mutagenézissel, illetve természetesen előforduló mutációk azonosításával. Mostanáig számos pillangós fajból izoláltak mutánsokat, melyeket keresztezések segítségével genetikailag jellemeztek (Caetano-Anollés és Gresshoff 1991., Kiss 1987a). A gümőképzési, illetve a szimbiotikus nitrogénkötési hatékonyság megváltozása alapján három kategóriába sorolhatjuk a növényi mutánsokat.

Az egyik csoportba azok tartoznak, melyek nem képeznek gümőt effektív baktériumtörzs jelenlétében sem. Ezeket nevezzük gümőképzési (**nodulációs**, vagy **Nod⁻**) mutánsoknak. Ezek kétfélék lehetnek (Caetano-Anollés és Gresshoff 1991.). Vannak olyanok, amelyeken a bakteriális fertőzést követően semmilyen válasz nem figyelhető meg, vagyis sem gyökérszőrgörbülés, sem kérgi sejtosztódás nem mutatható ki. Ide tartoznak például a szója *nod139* (Mathews és mtsai 1989.) mutánsa, melyet *rj5* *rj6*-nak is jelölnek (Mathews és mtsai 1986.), a borsó *sym8*-as (Markwei és LaRue 1992.) és a lucerna MnNC-1008-as (NN-1008) mutánsa (Peterson és Barnes 1981.). A keresztezésekből arra következtettek, hogy a mutáns allélok recesszívek a vad típusú alléllal szemben, és azt is megállapították, hogy az NN-1008 és az *rj5* *rj6* mutáció kialakulásáért két lokusz felelős (Peterson és Barnes 1981., Mathews és mtsai 1994). Az ebbe a kategóriába tartozó mutánsok különösen érdekesek, mivel a bakteriális indukcióra adott növényi válasz teljes hiánya miatt feltételezhető, hogy e növényekben a *Nod* faktor receptorát kódoló gén szenvedett mutációt, emiatt a növény képtelen "érezkenni" a baktérium jelenlétét (Dudley és Long 1989.). A **Nod⁻** mutánsok másik csoportját azok a növények alkotják, melyek nem képesek gümő kialakítására, azonban gyökérszőr deformáció illetve kérgi sejtosztódás indukálódása megfigyelhető. Többek



között a szója *nod49* és *nod772* (Mathews és mtsai 1989.) mutánsai tartoznak e kategóriába, melyek allélikusak a korábban már izolált *rj1* mutációval, valamint a borsó *sym2*-es mutánsa (Lie 1971.) is e csoport tagja.

A növényi szimbiotikus mutánsok másik kategóriáját a gümőt kialakító, de szimbiotikus nitrogénkötésre vad típusú baktérium jelenlétében is képtelen nitrogénfixációs (*Fix⁻*) egyedek alkotják. Nitrátot nem tartalmazó közegben a nitrogénhiány következtében a növények zöldtömege kisebb, gümőjük a vad típusú rózsaszín gümővel ellentétben fehér, és mutatják a *klorózis* jellegzetes tüneteit (pl.: levelek sárgulása). E mutáns-kategóriába tartoznak például a szója *Rj2*, *Rj3*, *Rj4* mutációi (Caetano-Anollés és Gresshoff 1991.), melyek dominánsan öröklődnek, a borsó *sym13* (Kneen és mtsai 1990.), és a lucerna *in1*, *in2*, *in3* és *in4in5* (Peterson és Barnes 1981.) mutánsai, melyeket tetraploid vonalakban azonosítottak, és recesszív öröklődésűnek bizonyultak. Hasonlóképp recesszív öröklődésű a csoportunk munkatársai által izolált *M. coerulea Fix1/9* mutáns is (Kiss 1987a), melyről a 2.6.1. fejezetben lesz szó.

Az eddig felsoroltak mellett harmadikként meg kell említeni az ún. "szupernoduláló" pillangósvirágú-mutánsokat is, melyekre az a jellemző, hogy hatékonyabb nitrogénkötésre képesek, mint a vad típusú egyedek, ezáltal zöld tömegük megnövekedik. Két pillangós fajból izoláltak ilyen mutánsokat mostanáig (hivatkozásokat lásd: Schultze és mtsai 1994.). Bár a fenotípus jellege nem zárja ki a poligénes öröklődés lehetőségét, mégis azt tapasztalták, hogy az izolált mutánsok monogénesek és recesszív módon öröklődnek (Carroll és mtsai 1985., Jacobsen és mtsai 1984.). Ilyen "szupernoduláló" növény a szója *nts382* (*nitrate tolerant symbiotic*) mutánsa, mely az egyébként gátló hatású magas exogén nitrátkoncentráció mellett is megtartotta gümőképzési képességét (Carroll és mtsai 1985a.). Mivel a növény alacsonyabb méretű a vad típushoz képest, nitrogénáz aktivitása viszont magasabbnak bizonyult, feltehetően az autoregulációs mechanizmust érintette a mutáció, mely a kialakuló gümők számát korlátozza. E kérdésre végleges választ csak a gén izolálásával

kapható, mely folyamatban van, a térképezésen alapuló génklónozás módszerének felhasználásával (Landau-Ellis és mtsai 1991.).

2.6.2. A genetikai térképezés jelentősége

Ha már rendelkezünk meghatározott funkcióban hibás gént tartalmazó egyed(ek)el, a mutáció által érintett gén további vizsgálatához, funkciójának megismeréséhez elengedhetetlenül hozzátartozik az adott gén izolálása. Ezt a feladatot a térképezésen alapuló génezolálás módszerének alkalmazásával oldhatjuk meg.

Egy molekuláris markerek felhasználásával készült genetikai térkép segítségével a mutációt szenvedett gének helyzetét megállapíthatjuk a genomban. Ezt követően a hozzájuk legközelebb elhelyezkedő DNS-markereket kiindulási pontként használhatjuk a "genomsétához", melynek segítségével az adott gént izolálhatjuk (Tanksley és mtsai 1989.). A vad típusú gén mutáns növénybe történő transzformálásával elvégzett komplementációs kísérletekkel igazolhatjuk, hogy az izolált gén funkcionális. Az e munka elvégzéséhez nélkülözhetetlen lucerna transzformációs és regenerációs rendszert Intézetünk munkatársai dolgozták ki (Deák és mtsai 1986.).

Az utóbbi több, mint tíz évben igen elterjedt a molekuláris markerek alkalmazása a genetikai térképezésben. A Restriktív Fragment Hossz Polimorfizmuson (Restriction Fragment Length Polymorphism v. RFLP), illetve a Random Amplifikált Polimorf DNS (Random Amplified Polymorphic DNA v. RAPD) technikán alapuló markerek használatának számos előnye van a klasszikus géntérképezéssel szemben. Egy több száz DNS-marker felhasználásával elkészített géntérkép lehetővé teszi egy adott gén térképhelyzetének pontos meghatározását. A nemrégiben kifejlesztett "kupacolási" technika (Michelmores és mtsai 1991.) felhasználásával pedig a keresett génhez nagyon közeli (< 10 cM) DNS-markerek izolálására van lehetőség, ami a génezoláláshoz szükséges genomséta útját jelentősen lerövidíti.

Az eukarióta szervezetekből történő génizolálás területén az utóbbi néhány évben elért eredmények (Rommens és mtsai 1989., Leung és mtsai 1994., Bent és mtsai 1994., Mindrinós és mtsai 1994.) igazolják azt az állítást, hogy a mutánsok szelekciója a genetikai térképezésen alapuló génizolálással párosítva egyedülálló lehetőséget biztosít funkcionális eukarióta gének azonosításához és jellemzéséhez.

2.6. Az értekezés eredményeit megalapozó előzmények

Csoportunkban Dr. Kiss György Botond vezetésével kezdődtek meg a lucerna szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő génjeinek megismerését célzó kutatások. E munka célja olyan növényi gének izolálása és jellemzése, melyek a gümőképzési folyamatban valamilyen specifikus funkciót látnak el.

2.6.1. Mutáns izolálás diploid *Medicago* fajokból

Mutánsok izolálása céljából lucerna magok kobaltbesugázással történő mutagenéziséből származó szimbiotikus nitrogénfixálási képességben hibás (Fix⁻) növényt azonosított Dr. Kiss György Botond munkatársaival a diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* lucernapopulációban. Az izolált mutánst elnevezték *Fix1*-nek, a mutációt szenvedett gént pedig *fix1*-nek. A mutáns növényvel számos keresztezési kísérletet végeztek. E vizsgálatokkal igazolták, hogy a mutáció monogénesen, recesszív módon öröklődik (Kiss 1987a.). Emellett mikroszkópos analízist végeztek a kialakult gümőkön, és megállapították, hogy a mutáció jellege hasonló a tetraploid lucernából izolált *in2* és *in3* mutánsokhoz (Kiss személyes közlés, Vance és Johnson 1983).

2.6.2. A lucerna genetikai térképének megszerkesztése

A genetikai megközelítés jelentőségét felismerve csoportunk munkatársai évekkel ezelőtt megkezdték a *Medicago sativa* komplexhez tartozó lucerna növények genetikai térképének megszerkesztését.

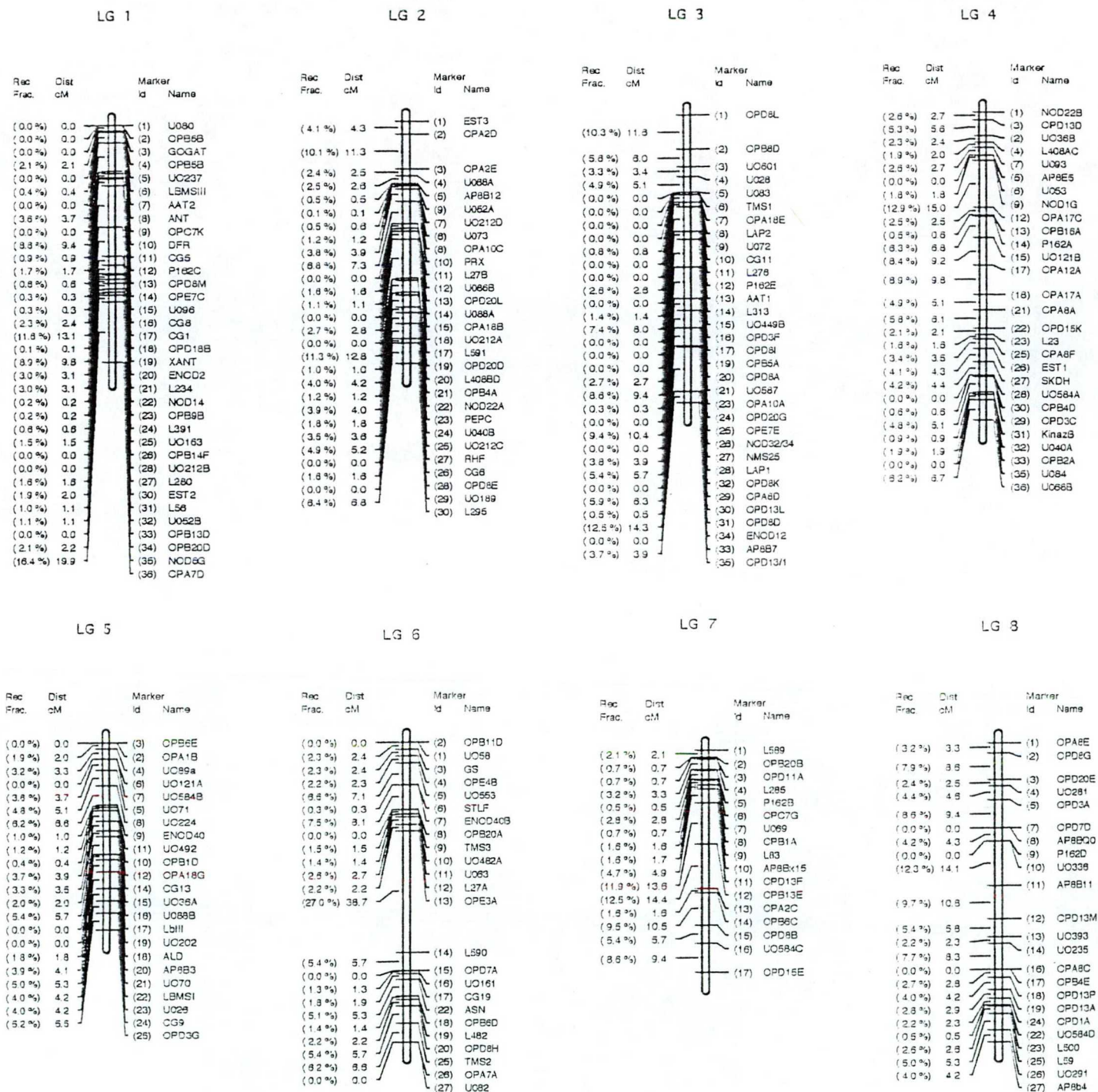
Első lépésként megfelelő növényeket kellett találni a térképezéshez. A legmegfelelőbbnek a *Medicago sativa* komplexbe tartozó diploid, kékvirágú *Medicago sativa* ssp. *coerulea* (Mc) és a szintén diploid, sárga virágszínű *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* (Mq) (Kiss és mtsai 1993.) bizonyult. Ezek az alfajok idegenbeporzó, évelő növények, egymással és a termesztett lucernával is keresztezhetőek, mégis elég távoliak ahhoz, hogy kellő számú genetikai polimorfizmust lehessen kimutatni belőlük. A kiválasztáskor igen fontos szempont volt, hogy e növények a csoportunkban régóta használt *Rhizobium meliloti* 41 baktériumtörzsszel effektív szimbiózist adnak (Kiss, személyes közlés). Mivel e fajok a tetraploid termesztett lucernával igen közeli rokonságban vannak, várható volt, hogy a diploidokon elért eredmények a nagyobb gazdasági jelentőségű tetraploid növényekre is érvényesek lesznek, ami elősegíti a gyakorlatban történő felhasználásukat.

A kiválasztott növényeket kereszteztük, majd az így előállított F1 populációból az F1/1 jelű növény önbeporzásával megkaptuk a 138 F2 egyedből álló térképező populációt. E populáció felhasználásával 89 morfológiai, izoenzim és DNS marker öröklődését követtük, és a kapott adatok alapján az egyes markerek sorrendjét megállapítottuk. Az ily módon megszerkesztett lucerna genetikai térkép nyolc kapcsoltsági csoportot tartalmazott, mely megegyezik a lucerna haploid kromoszómaszámaival (Kiss és mtsai 1993.). A betérképezett markerek száma folyamatosan bővül, mostanra meghaladta a 300-at (Kaló és mtsai 1994.), ami egyre jobb "felbontású" térképezést tesz lehetővé. A lucerna részletes genetikai térképét láthatjuk a 3. ábrán.

Az elkészült genetikai térkép lehetővé tette számos nodulációs gén helyzetének megállapítását, valamint a térképező populációban előforduló genetikai

polimorfizmusok azonosítását. Ez azt jelenti, hogy e populációban elvégezhetjük egyes, molekuláris szinten megjelenő, természetes mutációk kimutatását, öröklődésük vizsgálatát. E munka keretében tervezzük a *fix1* gén térképezését, valamint izolálását a térképezésen alapuló génizolálás felhasználásával.

A térképezés olyan mutációk azonosítására is alkalmas lehet, melyek fenotípusosan nem nyilvánulnak meg. E megközelítés eredményes alkalmazására szolgáltat példát az ENOD12 génnel kapcsolatos munkánk, melynek során bizonyítottuk, hogy térképező populációnk egyes növényei az ENOD12 gén különböző változatai (genetikai polimorfizmus) mellett egy természetes módon kialakult mutációt is tartalmaznak, miáltal a mutációt homozigóta formában tartalmazó növényekben lehetővé vált a gén funkciójának vizsgálata.



3. ábra. A lucerna nyolc kapcsoltsági csoportot tartalmazó részletes genetikai térképe (Kaló, személyes közlés 1993.) Az ábrán a markerek közötti rekombinációs értékek százalékát, és az e százalékértékek alapján, a Haldane térképfüggvény (Haldane 1919.) felhasználásával számított térképtávolságokat ábrázoltuk centimorganban kifejezve.

3. CÉLKITŰZÉS

Csoportunk munkájának alapvető célja a lucerna szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő génjeinek molekuláris szinten történő megismerése genetikai és biokémiai módszerek alkalmazásával. A dolgozatom tárgyát képező vizsgálatok elkezdésekor célunk volt az ENOD12 korai nodulációs gén szimbiózisban betöltött szerepének vizsgálata lucernában. Ennek során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- az általunk vizsgált lucernafajokban hány ENOD12 gén található,
- az elkészült lucerna genetikai térképen egy vagy több ENOD12 gént tudunk kimutatni, mely kapcsoltsági csoportban helyezkedik el az ENOD12 gén(ek), illetve a gének között van-e genetikai kapcsoltság,
- tudunk-e azonosítani diploid lucernapopulációinkban olyan egyedeket, melyek ENOD12 génjükben mutációt szenvedtek,
- a mutációt hordozó növények keresztezésével olyan egyedeket terveztünk előállítani, melyek homozigóta formában hordozzák a mutáns gént, ezáltal alkalmasak a gén esetleges funkciójának vizsgálatára,
- a mutáns homozigóta egyedek funkcionális vizsgálatával azt terveztük megvizsgálni, vajon van-e létfontosságú szerepe az ENOD12 génnek a szimbiózisban, és ha van, akkor milyen jellegű funkciót lát el,
- az ENOD12 szekvenciaadatok felhasználásával milyen evolúciós rokonsági viszonyokat tudunk megállapítani az egyes pillangósvirágúak között.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növényi anyag, és a térképező populáció előállítása

A sárgavirágú, diploid ($2n=2x=16$) *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* Sinsk. (Lesins és Lesins 1979., Quiros és Bauchan 1988.) és a kék virágú, diploid ($2n=2x=16$) *Medicago sativa* ssp. *coerulea* Ledeb. (Lesins és Lesins 1979., Quiros és Bauchan 1988.) növények magjait Prof. Bócsa Iván Gödöllői Mezőgazdasági Egyetem Kutatóintézete, Kompolt) bocsátotta rendelkezésünkre. Az Mqk93 jelű egyedi *M. sativa* ssp. *quasifalcata* növényt használtuk anyaként, az Mcw2 jelzésű *M. sativa* ssp. *coerulea* egyedi növényt pedig apaként abban a keresztezésben, melynek során előállítottuk az F1 hibridnemzedéket (F1/1, F1/2, F1/4, F1/5, F1/11, F1/12 és F1/13), melyek átmeneti (zöld) virágszínűek lettek. A szülők, valamint az utódnemzedék eltérő virágszínei egyszerű bizonyítékai annak, hogy az F1 nemzedék egyedei valóban keresztezésből, nem pedig önbeporzásból származnak. Az F1/1 jelű egyedi F1 növény önbeporzásával állítottuk elő a második utódnemzedéket F2(S1[F1/1]). Az F2(S1[F1/1]) populáció 138 egyede szolgált szegregáló populációként a genetikai térkép elkészítéséhez (Kiss és mtsai 1993.). Az Mcw2 növény önbeporzásával állítottuk elő az S1(S1[Mcw2]) utódokat. A növényeket 30 cm átmérőjű cserepekben neveltük üvegházi körülmények között 22-27 C^o-on 16 órás fényperiódussal. Mivel a növények évelők, rendszeresen metszettük őket és évente új cserépbe átültettük.

4.2. Nodulációs teszt

Az Mqk93, Mcw2, F1/1, F2/11 és F2/35 jelzésű növényeket vegetatíven szaporítottuk hajtásdarabkák gyökereztetésével steril vermikulitban és tápoldatban (1.4 mM KNO₃, 0.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0.5mM [NH₄]₂SO₄, 2.32 MM Ca[NO₃]₂, x

4 H₂O, 0.037 mM KCl, 0.05 mM H₃BO₃, 0.05 mM EDTA, 8 uM MnSO₄, x 4 H₂O, 0.5 uM ZnSO₄ x 7 H₂O, és 0.25 uM CuSO₄ x 5 H₂O, pH 5.7). Minden vonalból minimálisan öt növényt neveltünk 5 napig a tápoldat folyamatos biztosításával. Ezután a tápoldatot lecseréltük csökkentett nitrogéntartalmú (0.25 mM KNO₃) oldatra, és a gyökereket *Rhizobium meliloti* 41 vagy AK631 (Bánfalvi és mtsai 1981.) baktériumtörzsekkel inokuláltuk. A gümőket 30 nappal a fertőzés után gyűjtöttük össze szerkezetanalízis céljából. E gümők nitrogénkötési hatékonyságát acetilén redukció mérésével állapítottuk meg, gázkromatográfiás eljárás alkalmazásával (Hewlett-Packard, Palo Alto CA.).

4.3. DNS-technikák, hibridizáció

Totál növényi DNS-t 4-5 cm-es fiatal hajtásokból izoláltunk Dellaporta és munkatársai eljárása felhasználásával (Dellaporta és mtsai 1983.) Az izolált DNS-t restrikciós endonukleázokkal megemésztettük az enzimet előállító cég (Amersham Int., New England Biol.) által biztosított pufferben, 37 C^o-os vízfürdőben inkubálva. Az emésztett DNS-ből körülbelül 10 ug-ot 0.8 % töménységű agarózgélben, elektromos erőterben futtatva elválasztottunk (Maniatis és mtsai 1982.). Az elválasztást Tris-acetát pufferben (50 mM Tris, 20 mM acetát, 2 mM EDTA, 18 mM NaCl, pH 8.0) és 0.5 ug/ml EtBr-ot tartalmazó gélben végeztük. A megfuttatott DNS-t UV-fényben (260 nm) láthatóvá tettük és lefényképeztük. Ezután a gélben levő DNS-t kapilláris módszer alkalmazásával Hybond-N (Amersham Int.) membránra transzferáltuk (Southern 1975.). Hibridizációs próbaként a pBRC176 nevű plazmidról 5' és 3' specifikus primerek segítségével amplifikált MsENOD12A struktúrgént tartalmazó DNS-darabot (Allison és mtsai 1993.) használtuk. A primerek felhasználásával (5. ábra szekvenciák) az ENOD12A struktúrgén 239 bázispárt tartalmazó darabját tudtuk amplifikálni. Az amplifikált fragmenteket éjszakán keresztül Tris-EDTA pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA) dializáltuk. A dializált fragmenteket Feinberg és Vogelstein eljárásának

felhasználásával (Feinberg és Vogelstein 1983.) $0.5-5 \times 10^9$ dpm/ug DNS specifikus aktivitásig alfa- P^{32} -dCTP izotóppal megjelöltük. A prehibridizációt és a hibridizációt 10 ml G+C puffert (Church és Gilbert 1984.) tartalmazó csövekben légfűtéses hibridizációs inkubátorokban hajtottuk végre (Robbins Scientific). A prehibridizáció időtartama 10 perc és 2 óra között volt, a hibridizációt 10-16 órán keresztül végeztük. A hibridizációs próba aktivitása $0.2-5.0 \times 10^6$ dpm/ml volt, a hibridizáció hőmérséklete pedig 65 C° vagy 55 C° volt. Hibridizálás után a filtereket 0.1 % SDS- és 0.1 % SSPE-t tartalmazó pufferben mostuk négyszer húsz percig. Az oldat/puffer arány 750 ul/cm^2 volt, a mosás hőmérséklete pedig megegyezett a hibridizációéval. A filtereket ezután autoradiografáltuk, amihez Medifort RP (Forte, Vác) röntgenfilmet használtunk. Az autoradiográfiát -70 C° -on végeztük.

4.4. Genomikus DNS-szakaszok PCR-amplifikálása

Az ENOD12 gén jelenlétét a növényi genomban PCR (polimeráz láncreakció) technika felhasználásával végeztük. Templátként a fentebb már említett DNS-tisztítási eljárással készült totál növényi DNS-t használtuk, primerként pedig az ENOD12-specifikus oligonukleotidokat (Allison és mtsai 1993.). A reakciót 25 ul elegyben hajtottuk végre, amely a következő komponenseket tartalmazta: 1 x Taq polimeráz puffer (Promega Corp.); 1 U Taq polimeráz (Promega Corp.); 1.5 mM MgCl_2 ; 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP; 1 pmol/ul primer. A reakcióelegyet 20 ul ásványolajjal fedtük be. Ezt követően a csöveket egy programozható termosztátba helyeztük (LEP Scientific, MJR), és az alábbi hőmérsékleti ciklust programoztuk be: 94 C° 30 másodperc, 55 C° 1 perc, 72 C° 1 perc, 35-ször ismételve.

4.5. A PCR termékek klónozása és szekvenálása

A PCR termékeket 2 % agaróz gélen választottuk el, a fentebb leírt módszerrel. A DNS fragmenteket DE81 papírra futtattuk, majd e papírról 60 C^o hőmérsékleten, magas sókoncentrációjú oldatban visszaizoláltuk. Mivel a *Taq* polimeráz a PCR fragmentek 3' végeire nagy gyakorisággal extra adenin nukleotidot szintetizál, az eredményes klónozáshoz szükséges e nukleotid(ok)nak az eltávolítása. E célra klónozendó fragmenteket *mung bean nukleáz* (Pharmacia) kezeltük, mely csak az egyszálú DNS-láncot hasítja nukleotidokra. Az ily módon tompa végűvé alakított fragmenteket mindkét orientációban beklónoztuk az M13mp19 fágvektor HincII helyére (Yanish-Perron és mtsai 1985.). A szekvenálást a Sanger által leírt módszer felhasználásával végeztük (Sanger és mtsai 1977., 1980.), 2 U Sequenase 2 enzim felhasználásával (US Biochem.).

4.6. Izoenzim analízis

A LAP izoenzim mintázat megállapítására az alábbi eljárást használtuk: 50 mg friss, fiatal levelet homogenizáltunk 80 ul extrakciós pufferben (100 mM MES, 15 % v/v ethylene glycol, 2 % v/v mercaptoethanol, 100 mM szacharóz és 0.1 M PMSF, pH 6.8). Az oldatot mikro centrifugacsőben 15 000 rpm-el 40 percig 4 C^o-on centrifugáltuk. A felülúszó 8 ul aliquotjához 40 % szacharózban oldott 8 ul brómfenol kék oldatot adtunk, és felvittük nem denaturáló poliakrilamid géltre (160 x 100 x 1 mm, 7.5 %), és Tris-glicin pufferben elektroforetizáltuk (Ornstein és mtsai 1964.). A gélt állandó feszültséggel futtattuk (40/80 V) 16-20 órán keresztül. A géleket LAP enzimaktivitásra festettük a Vallejos által leírt eljárással (Vallejos 1983.)

4.7. A genetikai kapcsoltság számítása

A genetikai kapcsoltság mértékének megállapításához az ENOD12 és a LAP1 gének genotípus adatait használtuk fel. A genotípusokat két populációban vizsgáltuk. A térképező populációban az egyes gének alléljait a következőképpen jelöltük: ENOD12 gén: ha az adott egyedben jelen van az ENOD12^{q14} gén = E+; ha nincsen jelen (null allél) = E-. LAP1 gén: ha az adott egyed a csak a LAP1 felső csíkot tartalmazza (vagyis homozigóta erre az allélra): L^qL^q, ha csak a LAP1 alsó csíkot tartalmazza (vagyis homozigóta az alsó csíkra): L^{w1}L^{w1}, ha az adott egyed a LAP1 lokusz mindkét csíkját tartalmazza, vagyis heterozigóta: L^{w1}L^q. Az Mcw2 növény önbeporzásából származó populációban a két gén alléljait a következőképp jelöltük: ENOD12 gén: ha jelen vannak az ENOD12^{w25} és ENOD12^{w17} gének = E+; ha nincsenek jelen (null allél) = E-. LAP1 gén: ha az egyed csak a LAP1 felső csíkját tartalmazta (homozigóta a felső csíkra) = L^{w2}L^{w2}; ha csak az alsó csíkot tartalmazta (homozigóta az alsó csíkra) = L^{w1}L^{w1}; ha mindkét csíkot tartalmazta (heterozigóta) = L^{w1}L^{w2}. A leírásból látható, hogy az ENOD12 allélok domináns-recesszíven öröklődő markerek, a LAP1 pedig kodomináns öröklésmenetet mutat.

Az egyes lokuszok közötti kapcsoltság mértékének meghatározásához számítógépet használtunk, ami azt jelentette, hogy az egyes genotípus adatokat számokkal kellett jelölnünk, hogy a gép számára az egyes adatok értékelhetőek legyenek. Ennek az igénynek megfelelően mindkét populációban számoztuk az ENOD12 és a LAP1 lokuszok alléljait az alábbiak szerint: Térképező populáció;

- 1: az egyed homozigóta az anyai allélra (L^qL^q),
- 3: az egyed homozigóta az apai allélra (L^{w1}L^{w1}),
- 2: az egyed heterozigóta, mindkét allélt hordozza (L^{w1}L^q),
- 4: az egyed nem homozigóta az anyai allélra (ilyen kategória az ENOD12/LAP1 genotípusok között nincsen),
- 5: az egyed nem homozigóta az apai allélra (E+, ami lehet homozigóta E+ vagy heterozigóta E+/E-),
- 0: az adott egyedben erre a lokuszra nincs adat.

Az Mcw2 növény önbeporzásából származó populációban a genotípusok jelölése megegyezik a felsoroltakkal, kivéve, hogy e populációban 1-es számmal az $L^{w2}L^{w2}$ genotípust jelöltük, mely nem azonos az L^qL^q genotípussal.

Az adatokból a rekombinációs gyakoriságot és a kapcsoltság mértékét a maximális valószínűség (maximum likelihood) egyenlet (Allard 1956.) alkalmazásával számítottuk ki, a MAPMAKER program felhasználásával (Lander és mtsai 1987.), illetve Griffiths és munkatársai, valamint Rédei leírása alapján (Griffiths és mtsai 1993., Rédei 1987.). Egy adott rekombinációs gyakoriság (p) esetén várható genotípus-arányokat kontingencia-táblázatokban foglaltuk össze.

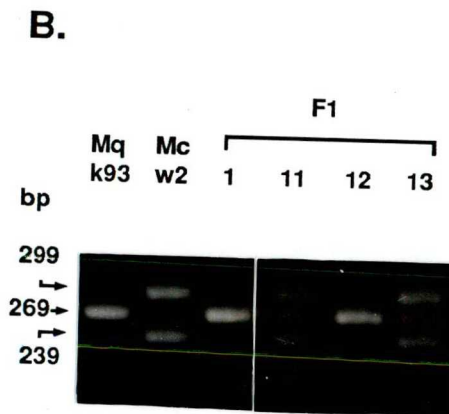
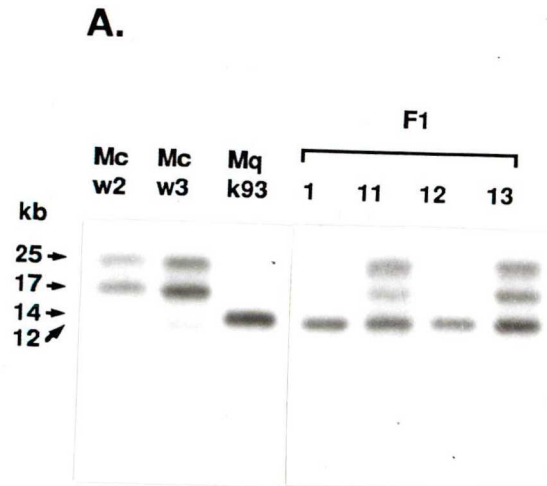
5. EREDMÉNYEK

5.1. Az ENOD12 gének jellemzése *M. s. quasifalcata* k93 és *M. s. coerulea* w2 növényekben

Mivel az egyes pillangós fajok különböző számú ENOD12 gént tartalmaznak (2.5. fejezet), kíváncsiak voltunk, hogy az általunk vizsgált lucernanövényekben hány ENOD12 gén található, illetve ezek hasonlóak-e más fajok génjeihez. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a két növény (Mcw2 és Mqk93) ENOD12 lokuszán ki tudunk-e mutatni genetikai polimorfizmust, ami lehetővé teszi a gén térképezését. A kérdések megválaszolásához Southern-hibridizációs és PCR amplifikációs kísérleteket végeztünk a két növényből származó DNS felhasználásával.

Elsőként az ENOD12 szekvenciák Southern hibridizációs mintázatát vizsgáltuk az egymással keresztezhető *M. s. coerulea* w2 (Mcw2) és *M. s. quasifalcata* k93 (Mqk93) lucerna növényekben. A Southern-hibridizációhoz az ENOD12A gén (SA) (Allison és mtsai 1993.) 239 bázispár hosszúságú fragmentjét használtuk fel hibridizációs próbaként, melyet a két növényből izolált és EcoRI restrikciós endonukleázzal megemésztett, totál növényi DNS-hez hibridizáltattunk. Eredményként azt kaptuk (4 A. ábra, Mqk93 és Mcw2 oszlopok), hogy az Mqk93 növény egy 14 kilobázis (kb) nagyságú, míg az Mcw2 növény három darab - egy 25, egy 17 és egy 12 kb nagyságú - EcoRI fragmentet tartalmazott. A két növényben tehát különböző ENOD12 gének találhatóak, vagyis a két egyed között genetikai polimorfizmus van az ENOD12 génben.

A fentebb leírt különbségeket polimeráz láncreakció (PCR) technika felhasználásával is ki tudtuk mutatni. A reakcióhoz templátként a két növényből izolált totál DNS-t használtuk, amelyeken az ENOD12 struktúrgénre specifikus 3' és 5' primerekkel végeztük el az amplifikációt. Az Mqk93 növényből egy 269 bázispáros (bp) fragment amplifikálódott (QA), míg az Mcw2-ből egy 299 bp-os (CB) és egy 239 bp-os (CA) fragmentet tudunk kimutatni (4 B. ábra Mqk93 és Mcw2 oszlopok). A PCR-



4. ábra. Az ENOD12 gének kimutatása diploid *M. s. quasifalcata* k93 (Mqk93) és *M. s. coerulea* w2 és w3 (Mcw2 és Mcw3) növényekben és ezek F1 utódaiban.

A. A szülői és utódnövények EcoRI enzimmel emésztett DNS-ének Southern hibridizációja ENOD12 specifikus próbával. Hibridizációs próbaként az MsENOD12A gént tartalmazó pBRC176 plazmidról 5' és 3' specifikus primerek segítségével amplifikált fragmentet használtuk. A hibridizációt magas hőmérsékleten (65 C⁰) hajtottuk végre. Az Mcw2 és az Mcw3 a *M. s. coerulea* populáció egyedi növényei.

B. Az ENOD12 primerek (5. ábra) használatával amplifikált fragmentek a szülői és utód DNS-ekből.

amplifikációs és Southern-hibridizációs eredmények alapján, azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az Mcw2 növény két különböző (ENOD12^{w25} és ENOD12^{w7}), az Mqk93 pedig egyféle ENOD12 gént (ENOD12^{q14}) tartalmaz. E feltevésünk bizonyításáról az 5.2. fejezetben lesz szó.

Azt is sikerült megállapítani, hogy az Mcw2 egyedből kimutatható két amplifikációs termék (CA és CB) mérete megegyezik a *M. sativa* növény megfelelő fragmentjeivel (SA és SB), míg az Mqk93 egyed (QA) amplifikátumának mérete azonos a *M. truncatula* növény megfelelő (TA) fragmentjének méretével. Az Mcw2 növényben található, 12 kb-os, gyengébben hibridizáló fragmentről az 5.4. fejezetben lesz szó.

5.2. Az ENOD12 gének evolúciója

Az Mqk93 és az Mcw2 növényekből származó amplifikációs termékek szekvenanciaanalízise lehetővé tette számunkra, hogy a korábban már közölt szekvenanciaadatok (Scheres és mtsai 1990a., Govers és mtsai 1991., Pichon és mtsai 1992., Allison és mtsai 1993.) felhasználásával a különböző pillangósvirágúak ENOD12 génei közötti rokonságot megállapítsuk. A korábban már említett egy Mqk93 és két Mcw2 amplifikációs terméket gélből izoláltuk és M13mp19 fágvektorba klónoztuk. Az Mcw2 növényből két klónt szekvenáltunk meg, melyek a nagyobbik, a 299 bp-os fragmentet (CB, CB/1) tartalmazták, és négy olyat, amelyek a kisebbet, a 239 bp-ost (CA, CA/1, CA/2, CA/3). A CB/1 megegyezett a CB-vel, kivéve, hogy egy bázispár hiányzott a 210. pozícióban. A CA és a CA/1 azonos volt, míg a CA/2 egy C nukleotidot tartalmazott a 272. pozícióban és a CA/3 egy C és egy T nukleotidot tartalmazott a 38. és 237. pozíciókban. Az Mqk93 négy klónját vizsgáltuk, melyek a 269 bp-os fragmentet tartalmazták (QA, QA/1, QA/2, QA/3). A QA/1 és a QA/2 klónokban egy T és egy A nukleotidot találtunk a 190. és a 242., a QA/2 pedig egy bázispáros deléciókat tartalmazott a 241. pozícióban. A QA/3 megegyezett a QA-val, kivéve, hogy ez a klón a 193-as pozíciótól kezdve csonkolt. E különbségeket a PCR

reakcióhoz használt Taq polimeráz enzim melléktermékeiként értelmezhetjük (Tindall és Kunkel 1988.). A CA, CB és QA szekvenciák közül egy-egy reprezentatívát az 5. ábrán figyelhetünk meg. Ezen az ábrán kisbetűvel jeleztük azokat a nukleotidokat, melyek nagy valószínűséggel a Taq polimeráz hibájából származó téves beépülések, melyeket a további számításoknál figyelmen kívül hagytunk. Feltételeztük, hogy a QA bázissorrendje reprezentálja az Mqk93 növény ENOD12q14 génjét, míg a CA és CB megfelel az Mcw2 ENOD12^{w25} és ENOD12^{w17} génjeinek. Az egyes szekvenciákat a *M. sativa* ENOD12B (SB) bázissorrendjének templátként való felhasználásával illesztettük (Allison és mtsai 1993.). Ebből az elrendezésből látszik, hogy az Mcw2-ből származó CA és CB gének nagymértékben homológok a *M. sativa* ENOD12B (SB) és ENOD12A (SA) génszakaszokkal. Azt is megállapítottuk, hogy az Mqk93 növény QA fragmentje hasonló a TA szekvenciához, amely a *M. truncatula* cv. Jemalong ENOD12 génjét jelöli (Pichon és mtsai 1992.). A CA, SA gének egy jellegzetes 30 bp-os, a QA és TA gének egy szintén jellegzetes 60 bp-os deléciót tartalmaztak. Ezek az eredmények alátámasztják feltételezésünket, hogy az Mcw2 növény két különböző, az Mqk93 pedig egy ENOD12 gént tartalmaz.

Amint az az 5. ábrán is látszik, a borsó PA és PB ENOD12 darabjait tartalmazó illesztett szekvenciák hasonlóak egymáshoz. A leglényegesebb különbségek azok a deléciók, melyeket a szekvenciák egymás mellé rendezésekor figyelembe kellett vennünk. Ezek a deléciók a leolvasási keretet nem változtatták meg, így ezek a gének különböző méretű, de hasonló funkcióért felelős fehérjéket kódolhatnak.

Az illesztett szekvenciák közötti nukleotid-különbségeket az összes párosítási lehetőség esetében kiszámoltuk. Az abszolút különbségek számát és százalékos értékeit tüntettük fel az 1. táblázatban. A deléciókat egy eltérésnek vettük. Az ebből számolt százalékértékek szintén megtalálhatók az 1. táblázatban, melyek alapján evolúciós fát készítettünk (6. ábra) az összekvencia módszer és a távolságmátrixon alapuló módszer felhasználásával (Kimura 1980., Saiton és Nei 1987.). A *Medicago* ENOD12 elágazási pontja A és B génre megelőzte a *M. truncatula* leválását a *M. sativa* komplexről, bár e két esemény igen közel van egymáshoz (6.1 +/- 0.4, 5.9 +/- 0.5). Az elágazási pontokat a

SB	<u>CTGCTCTTGTCTTGTTCCTCAAGGCTTTGCTGAATATTACCTTAATCCTGCCTATAGGC</u>	60
CBT.....	
TAT.....T.....	
QAT.....	
CA	
SA	
PAA.....AC.....C.....C.....TT.....GAA.....	
PBA.....A.....C.....C.....TTG.....GAA.....	
SB	CACCACAAACGAAACCACCGGTGAATAAGCCATCACACAAGGAACCACCAGTGCACAAGC	120
CB	
TA	
QAA.....	
CA	
SA	
PAGTG.ATGGG.....C.....G.A.GA.....G.T.T.....	
PBGTG.ATG.G...A.....C.....G.A.GA.....G.TT.T.....	
SB	CACCGCACAAAGGAACCACCAGTGAATAAGCCACGACACAAGGAACCGCCGGTCCACAAGC	180
CBG.....A.....	
TA	..T.A.....G.....C.....	
QA	...A.....G...C.C.....C.....A.....	
CAG...C.C.....C.....A.....	
SAG...C.C.....C.....A.....	
PA	...A.G.A.GA...G.TC.....C...A.A.G.A...AGG.T.....	
PB	...A.A.AA.GT.G.GTG.T...T...GA...A.A.G.....	
SB	CACCACACAAGGATCCACCTGTTAATAAGCCACCACAAAAGGAATCACCGGTGCACAAGC	240
CBG.....g.....	
TAG.....A.....	
QAA.G.....a.C.....	
CAA.G.....C.....	
SAA.G.....C.....	
PA	...A.A.G...GAGGC...A.....C...A.G...ATT...GT.A	
PBATT...GT--	
SB	CGCCACGCAAGGAACCACCAACGCATAAGCATCCTCCATCAGAAGATAACATCCATTTCC	299
CB	
TA	.A.....A.....T.....G.....G.....G.....	
QAG.....G.....?	
CA	.A.....G.....G.....?	
SA	.A.....G.....G.....G.....	
PA	.A-----A.....T.TTATGG...A.....A.GA...C.....	
PB	-----TTATG...A.....T.A.G.G...C.....A.....	

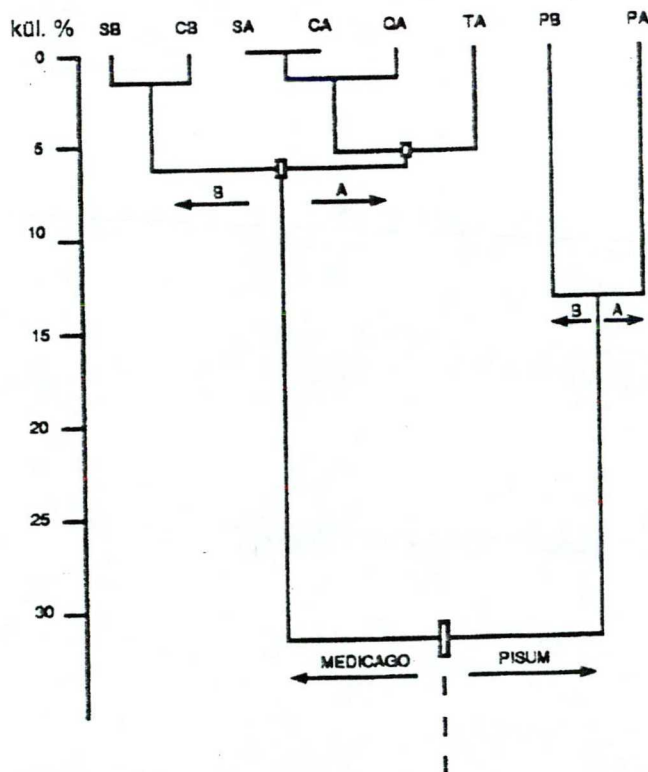
5. ábra Az ENOD12 gén szekvenciájának összehasonlítása. A szekvenciák csak a a gén ENOD12 specifikus primerek által közrefogott kódoló részét tartalmazzák. A specifikus primerszekvenciákat aláhúzással jelöltük. Rövidítések: SA és SB: a *M. sativa* cv Nagyszénási ENOD12A és ENOD12B génje, CA és CB: A *M. s. coerulea* ENOD12A és ENOD12B génje, QA: *M. s. quasifalcata* k93 ENOD12 génje, TA: A *M. truncatula* cv Jemalong ENOD12 génje, PA és PB: A Sparcle és Feltham First borsó kultivárok ENOD12A és ENOD12B génjei. A kisbetűk a lehetséges PCR-hibákat jelölik, a pöttyök az összehasonlítás során SB-vel megegyező nukleotidot jelölik, a szaggatott vonalak a deléciókat, míg a kérdőjelek ismeretlen nukleotidot jelölnek, mivel e régiót a PCR primer átfedte.

Különbségek száma

	SB	CB	TA	QA	CA	SA	PA	PB
SB		4	14	13	12	12	71	57
CB	1.6		12	11	11	11	69	53
TA	6.4	5.5		13	12	12	61	49
QA	5.9	5.0	5.9		3	3	61	48
CA	6.3	5.3	6.3	1.6		0	48	35
SA	6.3	6.3	6.3	1.6	0		48	35
PA	29.5	28.8	28.9	28.9	26.5	26.5		22
PB	33.7	31.4	34.5	34.5	32.1	32.1	13.0	

Különbségek %-a

1. táblázat Az ENOD12 szekvenciák közötti különbségek számának mátrixa. Minden lehetséges ENOD12 génpárosításra megadtuk a különbségek számát, melyeket az 5. ábrán látható szekvenciák illesztése során kaptunk. A primerrégiókat kihagytuk a számításokból. A különbségek abszolút értékéből a százalékos különbségértékeket is kiszámoltuk, és feltüntettük a táblázatban. A rövidítések megegyeznek az 5. ábránál használtakkal.



6. ábra Az ENOD12 gének lehetséges evolúciója. Az ENOD12 szekvenciák közötti százalékos különbségértékek felhasználásával készítettük el az ENOD12 gének evolúciós fáját. Az elágazások közötti minimum és maximum értékek a megfelelő adatok standard deviációi. Például a *Medicago* és *Pisum* elválásának elágazási értékeit az alábbi adatokból számoltuk: 29.5, 28.6, 28.9, 26.5, 26.5, 33.7, 31.4, 34.5, 32.1, 32.1. A *Medicago/Pisum* elválás átlagértékei és standard deviációja : 30.6 +- 2.9, a *M. truncatula/M. sativa* komplexnél 6.1 +- 0.4, a *Medicago* ENOD12A/B esetén 5.9 +- 0.5. A nyilak a különböző vonalak elválását jelölik. A rövidítések megegyeznek az 5. ábrán használtakkal.

közös ősz szekvencia módszerrel határoztuk meg (Kimura 1980.), melynek során figyelembe vettük a 268. pozícióban elhelyezkedő nukleotidokat (TA, QA, SA és CA együtt mutáltak), a TA és QA szekvenciákban található deléciók méretét és helyzetét csakúgy, mint az SA és CA szekvenciák delécióit. Az adatokból készült evolúciós fát láthatjuk a 6. ábrán, melyen az egyes fajok ENOD12 génjei, illetve ezt kiterjesztve az egyes növények közötti rokonságot ábrázoltuk.

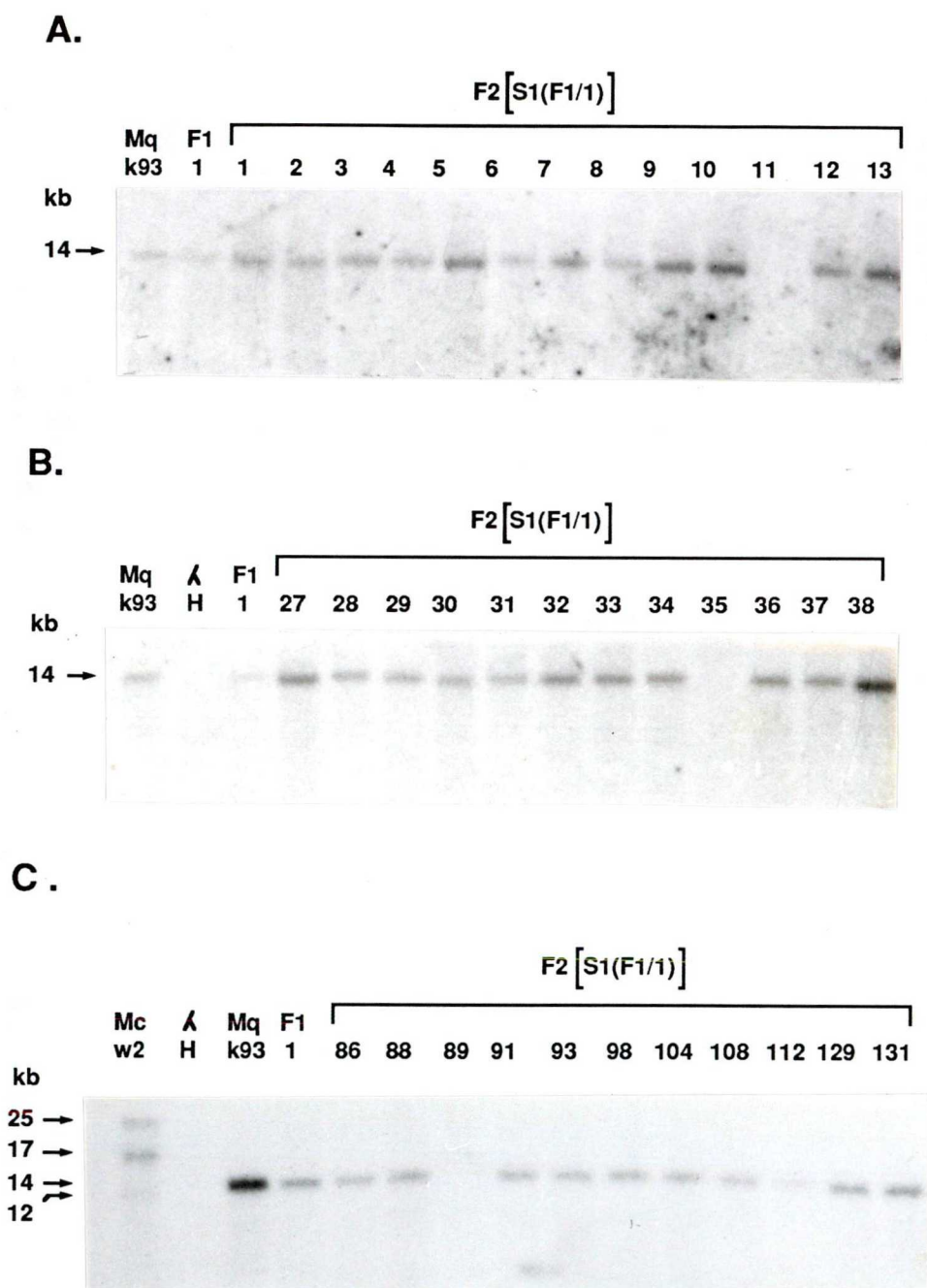
5.2. Az ENOD12 gének öröklődése az Mqk93 és az Mcw2 növények utódaiban: A null allél kimutatása

Mivel az Mcw2 és az Mqk93 növények ENOD12 génjei között genetikai polimorfizmust találtunk, a gén térképhelyzetét megállapíthattuk. Ehhez először a két növény keresztezéséből származó F1 utódokban az ENOD12 genotípusát határoztuk meg. A keresztezéshez az Mqk93-at használtuk anyanövényként, az Mcw2-t pedig apaként (Kiss és mtsai 1993.). Az F1 növények EcoRI restrikciós enzimmel emésztett DNS-ének ENOD12 specifikus próbával végzett hibridizálása során azt az eredményt kaptuk, hogy egyes F1 növények csak az Mqk93 növényben található ENOD12 gént (ENOD12^{q14}) örökölték, míg másokban mindkét szülő génje megtalálható (ENOD12^{q14}, valamint ENOD12^{w25} és ENOD12^{w17}). Az F1 populációból kiválogatott néhány egyed hibridizációs mintázata látható a 4 A. ábrán (F1 oszlopok). Az F1/1 és F1/12 csak az ENOD12^{q14} gént tartalmazza, míg az F1/11 és az F1/13 mindhárom (ENOD12^{q14}, ENOD12^{w25} és ENOD12^{w17}).

E növényekben az ENOD12 gének mintázatát PCR amplifikációs kísérlettel is vizsgáltuk, melynek eredménye a 4 B. ábrán látható. A DNS hibridizációs adatokkal megegyezően az F1/1 és az F1/12 egyedekben csak az Mqk93-ra jellemző 269 bp-os fragmentet tudtuk kimutatni, az F1/11 és az F1/13 utódokban pedig a két szülőre jellemző mindhárom DNS-szakasz amplifikálódott (239 bp, 269 bp, 299 bp). Mivel találtunk olyan F1 növényeket a két szülő utódai között, melyek csak az egyik szülőből

kiválasztottuk az F1/1 növényt, majd önbeporoztuk, és az ebből származó F2 utódnemzedékben (S1[F1/1]) vizsgáltuk az ENOD12 gének öröklésmenetét. E populációból származó 137 egyedi növény (egy növény kipusztult) EcoRI enzimmel emésztett DNS-ét hibridizáltuk az ENOD12 specifikus próbával. Tizenhárom olyan egyedet találtunk, melyek nem tartalmaztak az ENOD12 próbához hibridizáló fragmentet. E hibridizációból származó reprezentatív mintákat láthatunk a 7. ábrán. Megfigyelhetjük, hogy az F2/11, F2/35 és az F2/89 növények egyáltalán nem mutatnak hibridizációs jelet. E növények genomiális DNS-ével készített amplifikáción sem találunk ENOD12-re jellemző fragmentet (Csanádi és mtsai 1994.). Hipotézisünket alátámasztja az az eredmény is, hogy a Mcw2 növény önbeporzásából származó utódnövények között olyan növények is találhatóak, melyek nem tartalmazznak ENOD12 gént, vagyis homozigóták az ENOD12^{w0} allélra (5.4. fejezet).

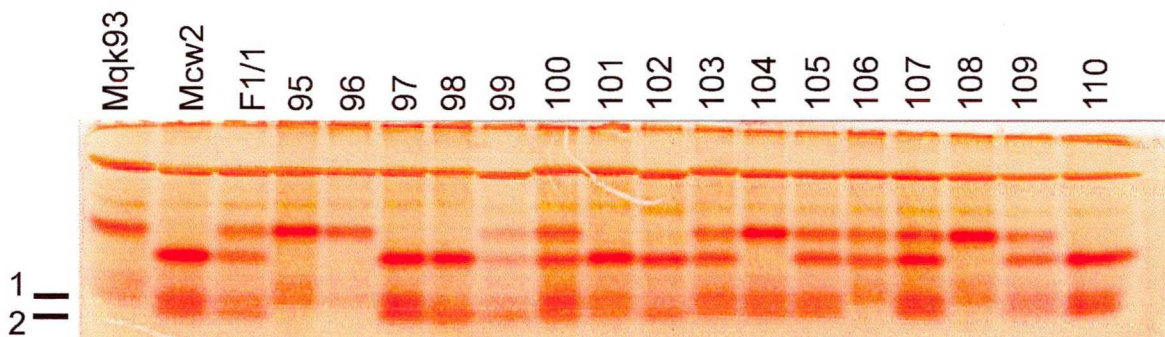
Az általunk vizsgált növények ENOD12 génjében kimutatott polimorfizmus lehetővé tette számunkra, hogy az egyes ENOD12 géneket térképezzük. Bár feltételezhető volt, azonban kísérletesen még nem bizonyítottuk, hogy a különböző ENOD12 gének ugyanabban a kromoszómarégióban helyezkednek el. Az egyes gének térképhehelyzetének megállapításához további kísérletekre volt szükség. A térképezési kísérletekkel választ kerestünk arra a kérdésre, hogy az általunk vizsgált növények genomjában található-e több, ENOD12 gént tartalmazó kromoszómális régió.



7. ábra Az ENOD12 allélok szegregációja az $S_1(F_1/1)$ populációban. Az ENOD12 specifikus próba hibridizációja az Mqk93, Mcw2 az $F_1/1$ és néhány kiválogatott S_1 utódhoz ($S_1[F_1/1]$). A 11, 35 és 89 számú S_1 növények bizonyultak null allélosnak.

5.3. Az ENOD12^{q14} gén térképhelyzetének meghatározása

Az Mcw2 és Mqk93 növények ENOD12 génjében kimutatott, az F1/1 növénybe öröklődő genetikai polimorfizmus (ENOD12^{q14}/ENOD12^{w0}) lehetővé tette számunkra a gén térképezését. A térképhely meghatározásához az F1/1 növény önbeporzásából származó F2 [S1(F1/1)] térképező populáció egyedeinek ENOD12 genotípusát állapítottuk meg. A térképező populációban az ENOD12^{q14} gén domináns-recesszív módon öröklődött, mivel heterozigóta állapotban az ENOD12^{q14} allél "eltakarja" a null allélt. A kapott genotípusadatokat számítógépbe vittük az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon, és ennek segítségével kerestük azokat a már ismert térképhelyzetű markereket, melyek az ENOD12^{q14} génnel kapcsoltságot mutatnak. Megállapítottuk, hogy e gén a lucerna genetikai térkép 3. kapcsoltsági csoportjának egyik végén elhelyezkedő LAP1 izoenzim génjétől (8. ábra) 23 centimorgan genetikai távolságra helyezkedik el (Kiss és mtsai 1993.). Ez a térképtávolság jó egyezést mutat a továbbfejlesztett genetikai térképen megfigyelhető 27 centimorgan (24 % rekombináció) távolsággal (Kaló személyes közlés 1993. 3. ábra).



8. ábra Az Mqk93, az Mcw2, az F1/1 növények, valamint az F2[S1(F1/1)] populáció néhány egyedének LAP1 genotípusa. Jelölések: 1 = L^q (Mqk - ből származó) allél, 2 = L^{w1} (Mcw2 - ből származó) allél.

Az F1/1 növénybe az ENOD12^{w25/w17} gének nem öröklődtek. Ez azzal a következménnyel járt, hogy a térképező populáció felhasználásával nem tudtuk meghatározni helyüket a kapcsoltsági térképen. Az eddigi térképezési munka során tehát csak az ENOD12^{q14} gén térképhelyzetét tudtuk megállapítani. Ez azt is jelentette, hogy nem tudtuk kizárni, hogy az ENOD12^{w25/w17} gének az ENOD12^{q14}-től eltérő kromoszómális régióban helyezkednek el az Mcw2 lucernanövény genomjában.

5.4. Az ENOD12^{w25} és az ENOD12^{w17} gének térképezése

Az előző fejezet végén leírt ok miatt, vagyis, hogy a genetikai térkép elkészítéséhez térképező populációként szolgáló F1/1 növénybe és annak utódaiba nem öröklődtek az Mcw2 szülőből származó gének (ENOD12^{w25/w17}), e két gén térképhelyzetének megállapítására más megközelítést alkalmaztunk. A gének térképezésére azért volt szükség, mert ennek révén bizonyíthatjuk, hogy vajon az ENOD12^{w25/w17} ugyanabban a kromoszómális régióban található-e, mint az ENOD12^{q14} allél.

Az ENOD12^{w25} és az ENOD12^{w17} gének térképhelyzetének megállapítása céljából szegregációjukat megvizsgáltuk az Mcw2 növény önbeporzott utódaiban (S1[Mcw2]), és a kapott genotípusadatokat felhasználtuk a LAP1 génnel való kapcsoltság mértékének megállapítására. Amennyiben ez az érték közelítően egyezik az ENOD12^{q14}/LAP1 gének kapcsoltságának értékével, megállapíthatjuk, hogy az ENOD12^{q14} és ENOD12^{w25/w17} ugyanazon a kromoszómán helyezkednek el, viszont azt nem tudjuk meghatározni, hogy a LAP1 génhez képest melyik irányban található.

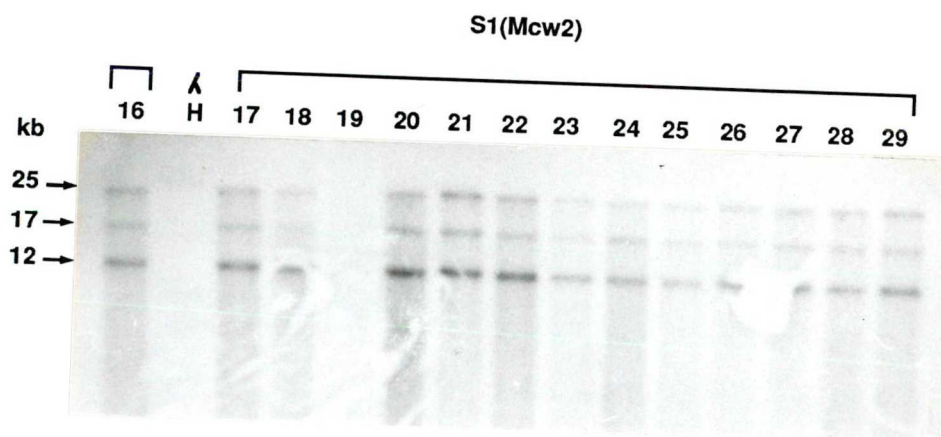
A 149 S1 utódból 137 egyed ENOD12 és LAP1 genotípusát határoztuk meg. Az ENOD12 genotípusokat DNS-DNS (Southern) hibridizációval és PCR amplifikációval határoztuk meg, a LAP1 esetében pedig az izoenzim mintázatot követtük nyomon. Néhány S1 utód Southern-hibridizációval megállapított ENOD12 genotípusát láthatjuk

a 9. ábrán, míg ugyanezen populációból származó egyedek LAP1 genotípusát a 10. ábrán tüntették fel.

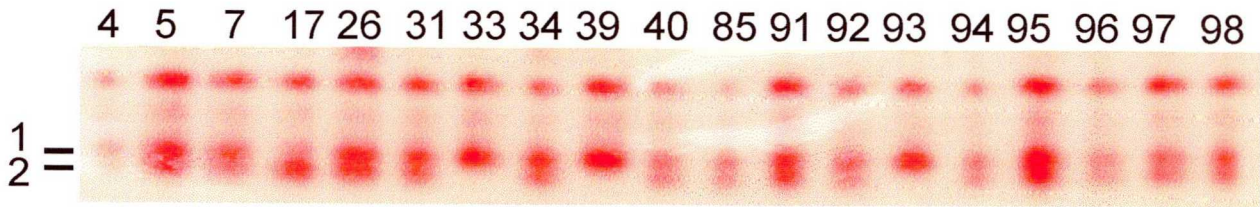
A.



B.



9. ábra Az ENOD12^{w25}/ENOD12^{w17} gének öröklődése az Mcw2 növény önbeporzással előállított utódaiban (S1[Mcw2]). A hibridizációt 55 C^o-on (a 4. ábrán látható hibridizációnál alacsonyabb hőmérsékleten) végeztük.



10. ábra Az Mcw2 növény önbeporzásából származó S1(Mcw2) populáció néhány egyedének LAP1 genotípusa. Jelölések: 1 = L^{W2} allél; 2 = L^{W1} allél. A térképezéshez használt F1/1 növénybe közülük csak a 2 jelű (L^{W1}) allél jutott át.

Az ábrán az Mcw2 növényre jellemző két LAP1 allél szegregációja látható. A Southern-hibridizáció során az Mcw2 növény két felső, ENOD12-vel hibridizáló sávja ($ENOD12^{w25}$ és $ENOD12^{w17}$) egységes mintázatot mutatott, míg az alsó 12 kb-os sáv erőssége a hibridizációs körülményektől függően változott. Ez utóbbi ugyanis könnyen kimutathatónak bizonyult alacsony hőmérsékleten ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$), azonban igen gyengén látható abban az esetben, ha magasabb hőmérsékleten ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) hajtottuk végre a hibridizálást. (ld. 4. ábra és 9. ábra összehasonlítva). E fragment részletes tárgyalását a 6. fejezetben találjuk.

A legtöbb utód örökölte az $ENOD12^{w25}$ és $ENOD12^{w17}$ géneket, azonban néhány közülük nem adott hibridizációra utaló jelet (2, 8, 10, 11, stb. S1 növények). Ez az eredmény alátámasztja hipotézisünket, hogy az Mcw2 szülő heterozigóta az ENOD12 lokuszra és egy null allélt ($ENOD12^{w0}$) hordoz az egyik, valamint az $ENOD12^{w25}/ENOD12^{w17}$ géneket a másik homológ kromoszómáján.

Az S1(Mcw2) populáció 114 egyedének $ENOD12^{w25/w17}$ és LAP1 genotípusadatait használtuk a két gén közötti genetikai távolság meghatározására. Bár

mindkét gén torzult (distorted) szegregációt mutatott, kapcsoltságukat meg tudtuk állapítani. Az ENOD12 genotípusok aránya:

$$E+ : E- = 93 : 21,$$

a LAP1 genotípusarány pedig:

$$L^{w2}L^{w2} : L^{w2}L^{w1} : L^{w1}L^{w1} = 26 : 66 : 22$$

volt. Az egyes genotípusadatok ellenőrzése során megállapítottuk, hogy az adatok torzultak, és a torzultság mértéke az egyes gének esetében hasonló. A két gén közötti kapcsoltság mértékének számításához felhasznált S1(Mcw2) egyedekben a következő genotípus-megoszlást kaptuk a ENOD12/LAP1 gének esetében:

$E+ : L^{w1}L^{w1} = 11$ egyed	$E- : L^{w1}L^{w1} = 11$ egyed
$E+ : L^{w1}L^{w2} = 56$ egyed	$E- : L^{w1}L^{w2} = 10$ egyed
$E+ : L^{w2}L^{w2} = 26$ egyed	$E- : L^{w2}L^{w2} = 0$ egyed

A kapott adatokból számolt genotípus-arányokat a 2.A. táblázatban mutatjuk be.

Az adatokból a két gén közötti rekombinációs gyakoriságot és térképtávolságot a maximális valószínűség (maximum likelihood) egyenlet alapján, a MAPMAKER program (Lander és mtsai 1987.) felhasználásával számítottuk ki. Megállapítottuk, hogy az S1(Mcw2) populációban a két gén között a rekombináció értéke 21 %, mely jó egyezést mutat ezekre a génekre a térképező populációban meghatározott 24 % (Kaló személyes közlés 1993. 3. ábra) rekombinációs gyakorisággal. A rekombinációs értékekből a MAPMAKER program felhasználásával a Haldane térképfüggvény (Haldane 1919.) alapján történő számításokkal 28 centimorgan térképtávolságot kaptunk. Ez jó egyezést mutat a térképező populációban kapott 27 centimorgan (Kaló, személyes közlés 1993. 3. ábra) értékkel.

Az S1(Mcw2) populációban a LAP1/ENOD12 gének között 21 % ($p=0.21$) rekombinációs gyakoriság esetén várható genotípus-megoszlást szintén a 2.A. táblázatban láthatjuk. Ezeket az arányokat összevetve a kapott genotípusértékekből számolt arányokkal (2. táblázat), jó egyezést találunk, bár meg kell állapítanunk, hogy az adataink torzultak.

LAP1/ENOD12 genotípusadatok kontingenciatáblázata az S1(Mcw2) populációban

Várt értékek p=0.21		ENOD12w25/w17	
		5 (E+)	3 (E-)
LAP1	1 (lw/w)	0.2388	0.011
	2 (Lw/w)	0.4168	0.0828
	3 (LwLw)	0.0938	0.156

Kapott értékek		ENOD12w25/w17	
		5 (E+)	3 (E-)
LAP1	1 (lw/w)	0.228	0.0000
	2 (Lw/w)	0.4912	0.0877
	3 (LwLw)	0.0964	0.0964

OPD13-1/LAP1 genotípusadatok kontingenciatáblázata az S1(Mcw2) populációban

Várt értékek p=0.28		OPD13-1	
		1 (O-)	4 (O+)
LAP1	1 (lw/w)	0.1296	0.1204
	2 (Lw/w)	0.1008	0.3992
	3 (LwLw)	0.0196	0.2304

Kapott értékek		OPD13-1	
		1 (O-)	4 (O+)
LAP1	1 (lw/w)	0.1240	0.1167
	2 (Lw/w)	0.1094	0.4817
	3 (LwLw)	0.0145	0.1532

OPD13-1/ENOD12 genotípusadatok kontingenciatáblázata az S1(Mcw2) populációban

Várt értékek p=0.05		ENOD12w25/w17	
		5 (E+)	3 (E-)
OPD13-1	1 (O+)	0.2494	0.0006
	4 (O-)	0.5006	0.2494

Kapott értékek		ENOD12w25/w17	
		5 (E+)	3 (E-)
OPD13-1	1 (O+)	0.2536	0.0000
	4 (O-)	0.5501	0.1956

2. táblázat. Három marker genotípusadatai százalékban kifejezve az S1(Mcw2) populációban

A térképező és az S1(Mcw2) populációban a LAP1 és ENOD12 gének között kapott rekombinációs százalékok és térképtávolságok összehasonlítása alapján megállapíthattuk, hogy az ENOD12^{w25/w17} gének genetikailag kapcsolatosak a LAP1 génnel, és attól való genetikai távolságuk hasonló az ENOD12^{q14}/LAP1 gének térképtávolságához.

Az is kiderült továbbá, hogy az általunk vizsgált populációkban egyetlen olyan egyed sem találtunk, melyben az ENOD12^{w25} és az ENOD12^{w17} között rekombináció történt (vagyis mindkét hibridizáló fragment mindig együtt öröklődött), ami azt jelenti, hogy e két gén szoros kapcsoltságot mutat.

Az eredmények alapján azonban nem lehetett eldönteni, hogy az ENOD12^{w25/w17} gének a LAP1 génhez képest a kromoszóma vége felé (mint az ENOD12^{q14}) vagy azzal ellentétes irányban helyezkednek-e el, azaz valóban ugyanabban a kromoszómális régióban található-e, mint az ENOD12^{q14}. A kérdést a három pontos térképezés alkalmazásával terveztük megválaszolni. Ennek során három genetikai marker egymáshoz viszonyított térképtávolságait határozzuk meg, amiből az egyes markerek sorrendje egyértelműen megállapítható.

5.5. Az OPD13/1 RAPD marker felhasználása a hárompontos térképezéshez

Az ENOD12^{q14} gén a lucerna genetikai térkép harmadik kapcsoltsági csoportjának végén helyezkedik el, amint azt az 5.3. fejezetben részletesen tárgyaltuk. Ebben a kromoszómális régióban a LAP1 gén kivételével nem volt térképezett genetikai marker. A hárompontos térképezés megvalósításához első lépésként azonosítanunk kellett egy olyan markert, amely genetikailag kapcsolts mind az ENOD12^{w25/w17}, mind pedig a LAP1 génekkel. E markert használhatjuk harmadik pontként a térképezés során, melynek segítségével meghatározhatjuk az ENOD12^{w25/w17} gének helyzetét a LAP1-hez képest.

A genetikai marker azonosításához a Random Amplifikált Polimorf DNS (RAPD) nevű technikát (Williams és mtsai 1990.) használtuk. A PCR-amplifikáción alapuló eljárás lehetővé teszi genetikai markerek szegregációjának nyomonkövetését, térképhez tartozó meg határozását. E munka során 10 egységből álló, tetszőleges bázissorrendű oligonukleotidot használunk primerként a PCR reakcióban, és ilyen módon számos amplifikálódó DNS-fragmentet kapunk, melyek közül a polimorfizmust mutatók öröklésmentét követjük. A térképezéshez a korábban már említett, az Mcw2 növény önbeporzásából (S1[Mcw2]) származó, illetve a szintén említett térképező populációt használjuk. Az S1(Mcw2) populációban az ENOD12^{w25/w17} alléllal kapcsolt markert próbálunk azonosítani, majd e populációban meghatározzuk a marker távolságát a LAP1 és az ENOD12^{w25/w17} génektől. Ezt követően a térképező populációban kiszámítjuk a marker genetikai távolságát a LAP1 és az ENOD12^{q14} génektől. Ha a két populációban kapott értékek egyeznek, megállapíthatjuk, hogy az ENOD12^{w25/w17} és az ENOD12^{q14} gének ugyanabban a kromoszómarégióban találhatóak.

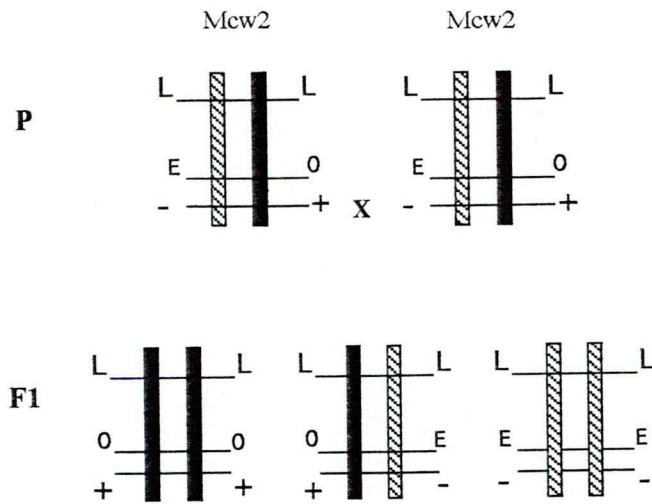
Elgondolásunk lényegét a 11. ábrán vázoltuk. Két lokuszt tüntettünk fel az ábrán, az ENOD12-t és egy RAPD-vel előállítottat. A RAPD marker esetében a + jelű allélról amplifikálódik a fragment, míg a - jelű allél esetében nem kapunk amplifikációt a reakció során. Ez a marker (hasonlóan az ENOD12-höz) domináns/recesszív módon öröklődő allélokot tartalmaz. Feltételezzük, hogy a + RAPD allél kapcsolt az ENOD12^{w0} (0) alléllal. Ez azt jelenti, hogy a PCR-reakció elvégzése után - a kapcsoltság mértékétől függően - azokban a növényekben kapunk RAPD amplifikációt, melyek tartalmazzák az ENOD12^{w0} allélt is, míg az ENOD12^{w25/w17} génekre homozigóta egyedekben nem. Az ábra felső részén az Mcw2, illetve annak önbeporzása eredményeképp kapott F1 egyedek ENOD12 és RAPD genotípusait láthatjuk. A kapott genotípusadatok felhasználásával a következő lépésben meghatározzuk a RAPD-marker, az ENOD12^{w25/w17} és a LAP1 gének genetikai távolságát az S1(Mcw2) populációban.

Az ENOD12^{w0}-al kapcsoltságot mutató RAPD markert az ábra alsó részén látható módon tudjuk térképezni a térképező populációban. Mivel a + allél az Mcw2

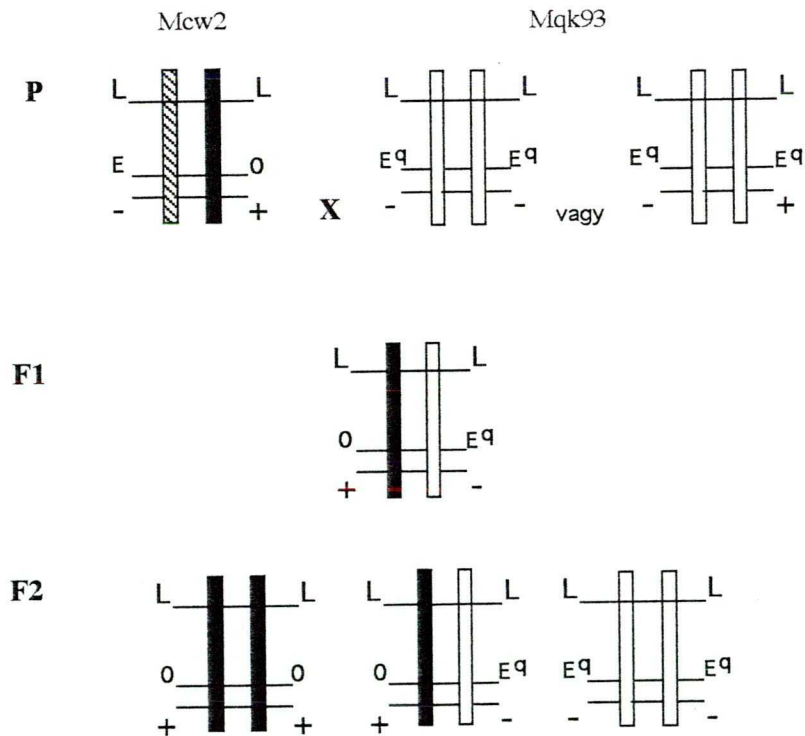
(ENOD12 null allélt tartalmazó) növényben jelen van, viszont az Mqk93-ban nem (vagy heterozigóta formában jelen van, de az F1/1 növénybe a - allél öröklődik), genetikai polimorfizmust kapunk. A null allél (0) az F1/1 növénybe és annak térképező populációként használt utódaiba öröklődött, így a vele kapcsolt RAPD marker (+) az F2 populációban az ábrán látható módon szegregálni fog. A genotípus adatok felhasználásával a RAPD lokusz térképhelyzetét, vagyis az ENOD12^{q14} és a LAP1 génektől való távolságát pontosan meghatározhatjuk. Ha a térképtávolságok közelítően megegyeznek az S1(Mcw2) populációban kapott értékekkel, megállapítható, hogy az ENOD12^{q14} és az ENOD12^{w25/w17} gének ugyanabban a kromoszómarégióban helyezkednek el.

A marker kereséséhez az Mcw2 növény önbeporzásából származó populáció 28 egyedét használtuk, melyek között homozigóta ENOD12^{w0}, homozigóta ENOD12^{w25/w17} és heterozigóta növények is voltak. Amikor az OPD13 nevű tíztagú oligonukleotidot használtuk primerként és az Mcw2, Mqk93, valamint ezek utódaiból (F1/1, S1[F1/1]) származó DNS-t templátként, találtunk egy olyan kb. 800 bp nagyságú amplifikálódó fragmentet (OPD13/1), amely az összes ENOD12^{w0} homozigóta, illetve heterozigóta egyedben megjelent, viszont azokban, amelyek nem tartalmazták az ENOD12^{w0} (ENOD12^{w25/w17}, ENOD12^{q14} homozigóták) allélt, nem kaptunk amplifikációt (12. ábra). Az Mcw2 populáció egyedeiből izolált DNS-ek ENOD12 próbával végzett Southern-hibridizációjának felhasználásával, a hibridizáló fragmentek intenzitása alapján választottuk ki azokat a növényeket, melyek nagy valószínűséggel homozigóták az ENOD12^{w25/w17} génekre. Az eredmény azt mutatta, hogy az általunk azonosított fragment genetikailag kapcsolt az ENOD12^{w25/w17} génekkel, vagyis a hárompontos térképezéshez felhasználható.

Mcw2 önbeporzott populáció



Térképező populáció



11. ábra. Az ENOD12w0 alléllal szorosan kapcsolt RAPD marker öröklődése az S1(Mcw2) és a térképező populációban. E = ENOD12w17/w25, 0 = ENOD12w0, Eq = ENOD12q14, L = LAP1.

Ezután az Mcw2 növény önbeporzásából származó 114 egyedben vizsgáltuk az ENOD12, a LAP1 és az OPD13/1 markerek genotípusait. A következő genotípus adatokat kaptuk:

$$\text{OPD13/1; O+ : O-} = 86 : 28$$

$$\text{ENOD12; E+ : E-} = 93 : 21$$

$$\text{LAP1; L}^{\text{w2}}\text{L}^{\text{w2}} : \text{L}^{\text{w1}}\text{L}^{\text{w2}} : \text{L}^{\text{w1}}\text{L}^{\text{w1}} = 26 : 66 : 22$$

Az adatokból megállapítottuk, hogy az OPD13/1 mendeli öröklődést mutató domináns allél, melynek szegregációja a 3:1 aránnyal jó egyezést mutat.

A gének közötti kapcsoltság mértékének megállapításához felhasznált egyedek vizsgálata során az egyes gének között az alábbi genotípus-megoszlásokat kaptuk az S1(Mcw2) populációban:

OPD13/1 - LAP1 genotípusadatok:

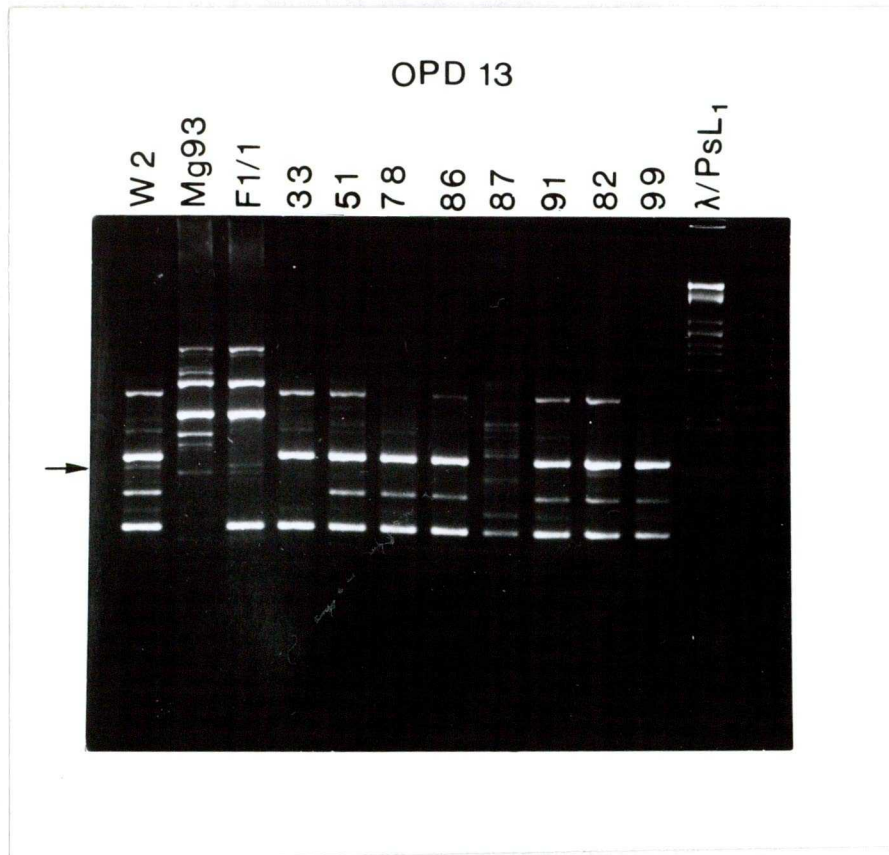
$$\text{O+ : L}^{\text{w2}}\text{L}^{\text{w2}} = 13 \text{ egyed} \qquad \text{O- : L}^{\text{w2}}\text{L}^{\text{w2}} = 13 \text{ egyed}$$

$$\text{O+ : L}^{\text{w2}}\text{L}^{\text{w1}} = 53 \text{ egyed} \qquad \text{O- : L}^{\text{w2}}\text{L}^{\text{w1}} = 13 \text{ egyed}$$

$$\text{O+ : L}^{\text{w1}}\text{L}^{\text{w1}} = 20 \text{ egyed} \qquad \text{O- : L}^{\text{w1}}\text{L}^{\text{w1}} = 2 \text{ egyed}$$

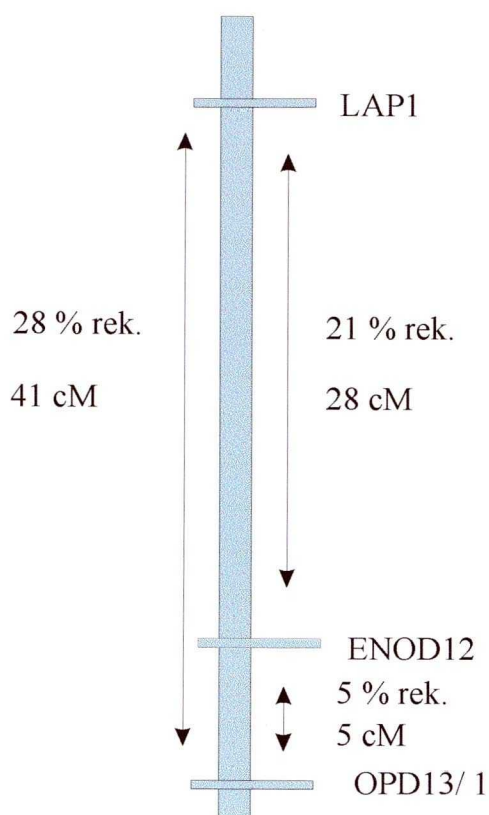
A kapott adatokból számolt genotípus arányokat tüntettük fel a 2.B. táblázatban.

Következő lépésként meghatároztuk az OPD13/1 marker genetikai távolságát a LAP1 géntől az S1(Mcw2) populációban. A MAPMAKER program felhasználásával számított rekombinációs gyakorisági érték 28 % volt a két lokusz között, amely a Haldane térképfüggvény alapján történő számítások (Griffiths és mtsai 1993., Rédei 1987.) után 41 centimorgan genetikai távolságot eredményezett. A rekombináció százalékkértéke és az ez alapján számított térképtávolság megegyezik a térképező populációban a két marker között számított 28 % rekombinációs gyakorisággal (Kaló személyes közlés 1993. 3. ábra) és 41 centimorgan térképtávolsággal. A $p = 0.28$ rekombinációs értéknél várható genotípus arányokat szintén a 2.B. táblázatban ábrázoltuk. Ha a térképező populációban a LAP1 és az OPD13/1 markerek genetikai távolságát a közjük térképeződő hat darab marker távolságértékeinek összeadásával számoljuk ki, 30 cM genetikai távolságot kapunk (3. ábra), ami mutatja a nagy genetikai távolságok esetén a térképtávolság értékek torzulását.

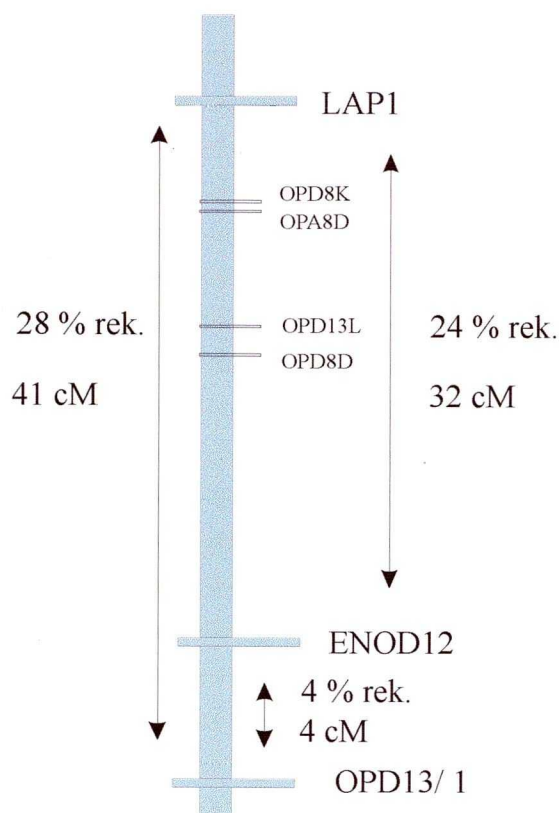


12. ábra Az OPD13/1 RAPD marker amplifikációja az ENOD12^{w25/w17} géneket homozigóta formában tartalmazó növényekben. A reakciót az Mcw2 növény önbeporzásából származó populáció (S1 [Mcw2]) hét kiválasztott egyedéből származó DNS-mintán végeztük, melyek az ENOD12^{w25/w17} génekre homozigóták. Kontrollként a két szülő (Mqk93 és Mcw2), az F1/1, valamint az S1(Mcw2) populációból származó null allélt (ENOD12^{w0}) is hordozó egyed (82) DNS-ét használtuk templátként az amplifikációhoz. A nyíl a kb. 800 bp méretű OPD13/1 fragmentet jelöli.

Vizsgáltuk mindkét populációban az OPD13/1 és az ENOD12 markerek közötti rekombináció mértékét is. Mivel transz helyzetben levő domináns/recesszíven öröklődő markerekről van szó, ebben a konfigurációban a rekombinánsok arányát, így a térképtávolságot is nehéz pontosan meghatározni. A két lokusz között az Mcw2 önbeporzott populációban kapott genotípus-gyakorisági értékeket a 2.C. táblázatban tüntettük fel. A MAPMAKER program felhasználásával végzett számítások alapján 5 % rekombinációs frekvencia értéket kaptunk, ami 5 centimorgan genetikai távolságnak felel meg. A $p = 0.05$ rekombinációs gyakoriság esetén várható genotípus-megoszlásokat szintén a 2.C. táblázatban találjuk. A várt és a kapott genotípus-arányok összehasonlításából kitűnik, hogy a genotípusadatok torzultak. E torzulás



S1(Mcw2) populáció



Térképező populáció

13. ábra. A LAP1, az ENOD12 és az OPD13/1 markerek közötti rekombináció százaléértékei és a Haldane térképfüggvény felhasználásával megállapított genetikai távolságok az S1(Mcw2) és a térképező populációban.

ellenére az OPD13/1 - LAP1 markerek között az S1(Mcw2) populációban kapott rekombinációs és térképtávolság értékek jó egyezést mutatnak ugyanezen két marker között a térképező populációban kapott 4 % rekombinációs és 4 centimorgan térképtávolság értékekkel.

A kapott eredményeket a 13. ábrán foglaltuk össze. Erről az ábráról leolvasható, hogy a három marker az Mcw2 önbeporzott és a térképező populációban kapott térképtávolsága jól egyezik, ami egyúttal azt is jelenti, hogy a három marker sorrendje megegyezik a két populációban, vagyis az ENOD12^{q14} és az ENOD12^{w25/w17} gének ugyanabban a kromoszómális régióban helyezkednek el.

5.6. Az ENOD12 gén expressziója *M. s. quasifalcata* és *M. s. coerulea* növényekben. A csak ENOD12^{w0} allélt tartalmazó növények gümőképzése és nitrogénfixáló képessége

Annak eldöntésére, hogy az általunk azonosított ENOD12 gének funkcionálisak-e, az Mqk93 és Mcw2 szülők gümőiből izolált RNS-en reverz transzkripció PCR (RT-PCR) analízist végeztünk. Eredményként megkaptuk az Mqk93 és Mcw2 növényekre jellemző ENOD12 fragmenteket. Annak megállapítására, hogy a keletkezett fragmentek valóban ENOD12 gének, e fragmenteket radioaktív izotóppal jelölt ENOD12-specifikus próbával hibridizáltuk. Az ENOD12 próba a fragmentekkel erős hibridizációt adott, így megállapíthattuk, hogy az RT-PCR módszer felhasználásával kimutatott DNS-szakaszok valóban ENOD12 gének. E kísérletekkel tehát igazoltuk, hogy az általunk vizsgált ENOD12 gének valóban kifejeződnek (Csanádi és mtsai 1994.).

Az ENOD12 gént nem tartalmazó növények gümőképzési hatékonysága nem különbözött a vad típusú egyedekétől. Sem a kialakult gümők számában, sem a gümők mikroszkópos struktúrájában, sem pedig a növények nitrogénkötési hatékonyságában nem tudunk különbséget kimutatni. Ezek alapján levontuk a következtetést, hogy a mi kísérleti körülményeink között, az általunk vizsgált lucernafajokban az ENOD12 gén jelenléte nem szükséges a hatékony gümőképzéshez és nitrogénkötéshez (Csanádi és mtsai 1994).

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy azok a diploid lucerna növények, melyek feltételezhetően természetes mutáció következtében nem tartalmazzák az ENOD12 gént, ugyanolyan hatékonyan kötik a nitrogént, mint az ENOD12 gént tartalmazó szüleik. Ezekből az eredményekből levontuk a következtetést, hogy - legalábbis a *Medicago sativa* komplexhez tartozó diploid lucernanövények esetében - az ENOD12 gén jelenléte nem létfontosságú a működőképes gyökérgümők kialakításához, és/vagy a hatékony nitrogénkötéshez. Munkánk során eredményesen alkalmaztuk a genetikai megközelítést egy nodulin gén gümőfejlődésben és nitrogénkötésben játszott szerepének vizsgálatára.

A gümőben megnyilvánuló gének közül azokat, melyek gyökérben nem fejeződnek ki, nodulin génnek nevezzük, függetlenül attól, hogy a növény más szerveiben expresszálódnak-e. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakulásának molekuláris szinten történő megismeréséhez elsősorban az infekciós folyamatban és a gümő organogenezis korai folyamatai során szerepet játszó nodulin gének, a korai nodulációs, vagy ENOD gének szerepét kell megvizsgáljunk. A genetikai megközelítés lehetővé teszi számunkra, hogy a szimbiotikus folyamat egyes lépéseiben gátolt, funkciójukban sérült, mutáns géneket hordozó egyedeket izoláljunk. A sérült funkcióért felelős gén vizsgálatával megismerhetjük az adott gén szerepét a funkcionális gümő kialakulásának folyamatában. A genetikai megközelítés alkalmazása nélkülözhetetlen a szimbiózis kialakításában szerepet játszó gének megismeréséhez.

A *M. sativa* komplexhez tartozó, idegenbeporzó diploid lucerna alfajok alkalmasnak bizonyultak szimbiotikus mutációk azonosítására. Nagyfokú heterozigótaságuk miatt számos genetikai változást szenvedett gént képesek hordozni az életképességük és/vagy a fenotípusuk megváltozása nélkül. Önbeporzás után számos mutáns génre nézve homozigóta állapotba kerülnek, melynek során a mutáció megnyilvánulhat (Kiss és mtsai 1993.). E megközelítés alkalmazásával csoportunk szimbiotikus

nitrogénfixálásban hibás (Fix^-) egyedeket izolált *M. s. coerulea* növényből. Hasonlóképpen eredményesnek bizonyult ez a módszer a dolgozatomban tárgyát képező, az ENOD12 gén null allélját hordozó mutáns növények azonosítására.

A genetikai kísérletekben gyakran használt kékvirágú diploid Mcw2 növényben két ENOD12 gént tudtunk kimutatni, melyek hasonlóak a *M. s. cv Nagyszénási* (Allison és mtsai 1993.) génekhez. A sárgavirágú diploid Mqk93 azonban csak egy ENOD12 gént tartalmazott, amely hasonlóan bizonyult a *M. truncatula cv. Jemalong* (Pichon és mtsai 1992.) ENOD12 génjéhez. Valószínű, hogy az ENOD12 génben lévő különbségek nem korlátozódnak a *Medicago* genusra, mivel különböző számú ENOD12 gént tartalmazó borsó kultivárok szintén leírtak már (Govers és mtsai 1991., Kozik és mtsai 1992.).

Az ENOD12 kódoló génei mellett heterozigóta konfigurációban egy null allélt detektáltunk az Mcw2 növényben. Az Mcw2 növény néhány utódjában kimutatható ENOD12 szekvenciát nem találtunk sem DNS-DNS hibridizációval, sem pedig PCR analízissel. E kísérleti eredmények legelfogadhatóbb magyarázata az ENOD12 régió hiánya e növényekben. Közvetett eredmények igazolják, hogy az ENOD12 gének hiánya nem egyedülálló jelenség. Az Mqk93 és a *M. truncatula* növények csak egy ENOD12 gént hordoznak ami a második gének hiányával is magyarázható. Másrészt egy mostanában közölt eredmény alapján a *M. s. cv. Iroquois* növényből nem sikerült ENOD12 homológ gént izolálni (Löbler és Hirsch 1993.). Ez annak feltételezésére vezetett minket, hogy a *M. sativa cv. Iroquois* olyan természetesen előforduló növény, mely szintén nem tartalmazza az ENOD12 gént. Emellett, mint azt később részletesebben kifejtve megtalálhatjuk, feltételezhetjük, hogy egyes *Medicago* vonalak ENOD12 génjének evolúciójában az inszerció és duplikáció mellett deléciós események is közrejátszottak.

Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a *M. s. coerulea* természetes magpopulációjából származó Mcw2 növény heterozigóta az ENOD12 génre, és egyik homológ kromoszómáján egy null allélt hordoz. Ez a null allél Mqk93 növényvel történő keresztezés után az F1/1 növénybe öröklődött. Az F1/1 növény ENOD12 alléljai ($\text{ENOD12}^{\text{q14}}/\text{ENOD12}^{\text{w0}}$) szegregáltak az F2 populációban, és e populáció 137

egyedéből 14 bizonyult homozigótának a null allélra (ENOD12^{w0}). A szegregáló populáció kapcsoltsági analízise azt mutatta, hogy az ENOD12q14/ENOD12w0 gének a 3. kapcsoltsági csoport végén helyezkednek el a LAP1 lokusztól 24 centimorgan távolságra (Kiss és mtsai 1993.), mely a térkép pontosítása során 27 centimorganra módosult (Kaló, személyes közlés 3. ábra). Az Mcw2 másik két, szorosan kapcsolt ENOD12 génje az ENOD12^{w25} és ENOD12^{w17} ugyanebbe a kromoszómarégióba térképeződtek 28 centimorganra a LAP1-től.

A genetikai térképezés során mindkét populációban kimutatható volt egyes genotípusadatok torzulása (disztorciója). Ennek hátterében az áll, hogy az általunk használt diploid lucerna növények idegenbeporzók, emiatt - mint azt már korábban emítettem - számos lokuszra nézve heterozigóták. Ez azt is jelenti, hogy számos mutációt, illetve olyan gént hordoznak heterozigóta formában, amelyek a növény életképességét csökkentik, vagy esetleg pusztulását okozzák (homozigóta állapotban letalitást okozó gének) abban az esetben, ha kifejeződnek (Kiss és mtsai 1993.). Az önbeporzás következtében számos, korábban heterozigóta állapotban levő lokusz válik homozigótává. Ha ezek között olyan lokusz is van, mely az adott növény számára létfontosságú funkciót kódoló génben szenvedett mutációt, vagy csökkent életképességet okoz homozigóta formában, akkor az e lokuszokat tartalmazó növények nem jelennek meg a szegregáló populációban, ami a szegregációs adatok torzulását eredményezheti.

Biokémiai és genetikai adatok jelzik azt, hogy az ENOD12 null allélját hordozó növények nem mozaikosak, a következő okok miatt. Egyrészt e növények 4-5 cm-es fiatal hajtásaiból több alkalommal izoláltunk DNS-t, és semmilyen ENOD12-re utaló specifikus hibridizációs szignált vagy PCR-terméket nem kaptunk. Másrészt, e növényeket számos alkalommal vegetatíven szaporítottuk, melyek megkülönböztethetetlenek voltak az anyanövénytől, és ezekből sem tudtuk az ENOD12 gén jelenlétét kimutatni. Harmadrészt, az F₂ növények effektív *R. melilotival* történő fertőzéséből származó gümőkben nem volt kimutatható ENOD12 mRNS. Negyedszer, a null allél az F₁/1 növény apai szülőjében volt jelen, mivel ennek önbeporzott utódai



recesszív mendeli markerként örökölték az ENOD12^{w0} allélt. Hasonlóképpen öröklődött a az ENOD12^{w0} allél az F1/1 növénybe, amikor az Mqk93-al kereszteztük a Mcw2-t. Ötödször, az F1/1 növény önbeporzásából származó egyetlen utódba sem öröklődtek az ENOD12^{w25} és az ENOD12^{w17} gének, valamint a null allél öröklődése sem random képet mutatott, hanem recesszív mendeli szegregációt, és az ENOD12^{w14} alléljaként térképeződött.

Jelenleg az ENOD12 funkciója ismeretlen. A feltételezett fehérjeszerkezet és az *in situ* hibridizációs adatok alapján azt gondolták, hogy egyes szövetekben a sejtfal kialakításában vehet részt, más kísérletekben pedig azt találták, hogy e génnek nincs szerepe a növényi védekezőmechanizmusban (Scheres és mtsai 1990a.). Az ENOD12 gén a HRGP (hydroxyprolin-rich glycoproteins) gének családjába tartozik, amely a különböző sejtfalfehérjék széles körét foglalja magában (Schowalter 1993.). Időbeli és térbeli kifejeződésük mintázatát DNS-hibridizációkkal meghatározták, és ezek az adatok azt mutatták, hogy e gének jelen vannak különböző növényi szövetek sejtfalában. E sejtfalproteinek funkciója azonban ismeretlen, és arra sincs adat, hogy ezek funkcionálisan komplementálni tudják-e egymást (Schowalter 1993.). Funkciójuk felderítése érdekében szükséges lenne e génekben hibás mutáns növényeket előállítani, vagy természetes mutánsokat izolálni, és ezek fenotípusát megvizsgálni. Az ENOD12-hiányos növények valójában ilyen mutánsoknak tekinthetők. Mivel e növények fenotípusa nem változott, nem zárhatjuk ki azt a feltételezést, hogy az ENOD12 gén nodulációhoz szükséges funkcióját valamely másik sejtfalfehérje képes átvenni. Bár két másik korai nodulációs gén az ENOD2 és az ENOD5 is a HRGP gének családjába tartozik, nem valószínű, hogy valamelyikük kompenzálná az ENOD12 gén kiesett funkcióját, mivel időbeli és térbeli kifejeződésük eltér attól. Másik feltételezés az, hogy esetleg létezik olyan, mostanáig még nem azonosított korai nodulációs gén, mely átveheti az ENOD12 funkcióját. E feltételezéshez kapcsolódik az az eredményünk, hogy az Mcw2 növény az ENOD12 próbával erős hibridizációt mutató két fragmenten (ENOD12^{w25/w17}) kívül tartalmaz egy 12 kilobázis méretű harmadik fragmentet is, melynek hibridizációs intenzitása a hibridizációs körülményektől függően változott (5.4.

fejezet). Ebből arra következtettünk, hogy a vizsgált növény a két ENOD12 gén mellett tartalmaz egy olyan fragmentet, melyben az ENOD12 génnel homológ szakasz(ok) található. Itt nem közölt eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a fragment nagy valószínűséggel nem azonos a Löbner és Hirsch által (Löbner és Hirsch 1993.) nemrégiben leírt, az ENOD12 génnel homológiát mutató ENOD10 génnel. Azonban, ha az általunk azonosított, az ENOD12 génnel homológiát mutató fragmentről feltételezzük, hogy működő gént kódoló régióról van szó, elképzelhető, hogy a hasonló szekvenciát tartalmazó gén hasonló funkcióért lehet felelős, amely adott esetben átveheti az ENOD12 gén szerepét. Azonban, mivel a mi populációinkban az ENOD12 null allélos egyedek nem tartalmazták ezt a halványan hibridizáló fragmentet, kizárhatjuk annak lehetőségét, hogy a mi körülményeink között ez a gén vette át az ENOD12 esetleges szerepét.

Az előzőekben leírt feltételezések azon alapulnak, hogy az ENOD12 génről keletkezik fehérje, és ennek van olyan funkciója, melyet esetleg egy másik gén kompenzálni képes. Azonban mostanáig még senkinek sem sikerült az ENOD12 fehérje jelenlétét bizonyítani. Emellett az is elképzelhető, hogy az esetleges ENOD12 fehérjének jelenleg semmilyen szerepe nincs a szimbiotikus folyamatban. Lehetséges, hogy valamikor funkcionális gén volt, de mostanra funkcióképtelenné vált, vagy fordítva. Számos más feltételezés is felállítható a gén funkcióját illetően, például, hogy az ENOD12 gén jelenléte létfontosságú valamely környezeti feltétel esetében, vagy egy adott *Rhizobium* törzssel kapcsolatban, azonban e feltételezések esetleges bizonyítása sem igazolná az ENOD12 gén nélkülözhetetlen szerepét a szimbiózis kialakításában.

Az Mqk93 és Mcw2 növények amplifikációs termékeinek megszekvenálása lehetővé tette számunkra, hogy ezeket egymással, illetve az irodalomban korábban már közölt bázissorrendekkel összehasonlítsuk, és hogy erre a génre evolúciós fát szerkesszünk. A szekvenciák illesztéséből látható, hogy az Mcw2 növény két génje homológ a *M. s. cv Nagyszénási* ENOD12A és ENOD12B megfelelő génjeivel. Érdekes módon, az ENOD12A gén azonos volt az Mcw2 megfelelő génjével, melyek közül mindkettőben

megtalálható volt a jellegzetes 60 bp-os deléció. Az Mqk93 ENOD12 génje igen hasonlóknak bizonyult a *M. sativa* cv. Nagyszénási és az Mcw2 ENOD12A génjéhez, azonban ez a *M. truncatula* cv. Jemalong növényre jellemző 30 bp-os deléciót hordozta. A 6. ábrán látható evolúciós fa azt mutatja, hogy a génduplikáció megelőzte a *M. sativa* és az *M. s. quasifalcata* szétválását. Mivel az Mqk93-ban nem tudtunk ENOD12B homológot kimutatni, valószínű, hogy a megfelelő gén a *M. s. quasifalcata* és a *M. sativa*/*M. s. coerulea* vonalak szétválása után deletálódott, vagy utána duplikálódott.

A *M. truncatula* cv. Jemalong és más *Medicago* alfajok megfelelő ENOD12A génjeinek szekvencia analízise azt jelzi, hogy a *M. truncatula* az ENOD12 gén A és B génre történő duplikációja után vált el, amint azt az 5. és 6. ábrán láthatjuk. Ezt az evolúciós elképzelést a génekben található deléciók is alátámasztják. A 30 bp-os deléció (és a 268. pozícióban történt mutáció) valószínűleg a génduplikáció után, és a *M. truncatula* speciációját megelőzően következhetett be. Ez magában foglalja annak feltételezését, hogy másodlagos deléciók fordultak elő a *M. sativa*/*M. s. coerulea* vonal e pozíciójában, amely a 60 bp-os deléciót eredményezte, s amivel párhuzamosan, ettől függetlenül az ENOD12B gének eltűntek a *M. truncatulából* és a *M. s. quasifalcatából*.

Befejezésül bízunk benne, hogy a disszertáció alapját képező, genetikai térképezésen és szimbiotikus növényi mutánsok jellemzésén alapuló genetikai megközelítést eredményesen fogjuk tudni alkalmazni funkciók és gének kölcsönös megfeleltetésére.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A lucerna egy korai nodulációs génjének, az ENOD12-nek a szerepét vizsgáltuk a *R. meliloti* - *Medicago* szimbiotikus folyamatban. E munka során a következő eredményeket értük el:

- DNS-DNS (Southern) hibridizációs és PCR-amplifikációs kísérletekkel kimutattuk, hogy a diploid *M. s. coerulea* növény két ENOD12-vel homológ fragmentet tartalmaz, és az amplifikációval előállított fragmentek mérete megegyezik a *Medicago sativa* SA és SB génjeivel. Hasonlóképp bizonyítottuk, hogy a szintén diploid *M. s. quasifalcata* növény csak egy méretű ENOD12-homológot hordoz, melynek nagysága a *M. truncatula* TA génjével egyezik,
- Keresztezéssel és önbeporzással előállított populációkban végzett térképezéssel igazoltuk, hogy a *M. s. coerulea* szülői növény heterozigóta formában ENOD12 null allélt hordoz.
- Bizonyítottuk, hogy a null allél az F1 populációban szegregál, és átjut a térképezési munkához felhasznált F1/1 növénybe, illetve annak utódaiban szegregál. Az F2 populációban homozigóta null allélos egyedeket azonosítottunk.
- Bizonyítottuk, hogy az általunk vizsgált lucernanövényekben az összes ENOD12 gén ugyanazon a genetikai lokuszon található, tehát csak egy ENOD12 lokusz van e növények genomjában.
- Térképeztük az *M. s. coerulea* és az *M. s. quasifalcata* ENOD12 génjeit és bizonyítottuk, hogy az ENOD12 null allél (tehát ahol az ENOD12^{w25/w17} génnek deléciója bekövetkezett) a többi ENOD12 génnel együtt a 3. kapcsoltsági csoport végén helyezkedik el.
- Kimutattuk, hogy az *M. s. coerulea* és az *M. s. quasifalcata* ENOD12 gének kifejeződnek *R. melilotival* indukált gyökérgümőkben, tehát funkcionális génekről van szó.

- A mutációra (null allél) homozigóta és vad típusú növények gümőszerkezetének és nitrogénkötési hatékonyságának összehasonlításával megállapítottuk, hogy a ENOD12 gén nem játszik létfontosságú szerepet az általunk vizsgált növények szimbiotikus folyamatában.
- Az ENOD12 nukleotidsorrend-adatok felhasználásával evolúciós fát szerkesztettünk, melyben a különböző pillangósvirágú fajok ENOD12 génjeinek rokonságára következtethettünk.

8. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Kiss G.B., Csanádi Gy., Kálmán K., Kaló P., Ökrész L. (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Molecular and General Genetics* 238:129-137

Csanádi Gy., Szécsi J., Kaló P., Kiss P., Endre G., Kondorosi Á., Kondorosi É., Kiss G.B. (1994). ENOD12, an early nodulin gene is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *The Plant Cell* 6: 201-213

8.2. Egyéb közlemények

Fehér, A., Preiszner J., Litkey Z., Csanádi Gy., Dudits D.. (1992). Effectiveness of X-ray irradiation in induction of chromosome instability in interspecific somatic hybridisation between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Theoretical and Applied Genetics* 84:880-890

Savouré A., Kaló P., Petrovics Gy., Csanádi Gy., Kiss G.B., Kondorosi Á., Kondorosi É. (1994). Identification, characterization and mapping of a full length cyclin gene in *Medicago sativa*. *Plant. Mol. Biol.* in press

8.3. Nemzetközi konferencia kiadványok

Kiss G.B., Csanádi Gy., Kálmán K., Kaló P., Ökrész L. (1992). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. 9th International Congress on Nitrogen Fixation. Cancún; pp.:355

Kiss G.B., Kálmán K., Csanádi G., Ökrész L., Györgyey J., Ráczkevy A.E., Brummer C., Kochert G. (1992). Construction of a basic genetic map of *Medicago*. EUCARPIA Congress. Lodi; pp. 56

Kiss G.B., Csanádi Gy., Kálmán K., Ökrész L., Györgyey J., Ráczkevy A.E. (1992). Construction of a genetic map for *Medicago* IS-MPMI, Sixth International Symposium On Molecular Plant-Microbe Interactions. Seattle, Washington. pp. 348

Kaló P., Endre G., Csanádi Gy., Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of alfalfa (*Medicago sativa*). 4th International Congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam pp. 24

Kaló P., Csanádi Gy., Endre G., Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of *Medicago sativa*. Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Edinburgh pp. 108

Kaló P., Endre G., Csanádi G., Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of *Medicago sativa*. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on Safe application of Genetically modified Microorganisms in the Environment. Kiss G.B., Endre G. (eds.) Szeged, Officina Press p:330

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). An improved linkage map for alfalfa. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference and the Workshop on Safe application of Genetically modified Microorganisms in the Environment. Kiss G.B., Endre G. (eds.) Szeged, Officina Press p:169

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). An improved genetic map for *Medicago*. In: 34th North American Alfalfa Improvement Conference. Guelph, Canada p:6

8.4. Hazai konferencia kiadványok

Csanádi G., Kaló P., Kiss P., Endre G., Szécsi J., Kondorosi É., Kondorosi Á, Kiss G.B. (1994). Az ENOD12 korai nodulációs gén szerepének vizsgálata diploid *Medicago* növényekben. In: A Magyar Genetikusok Egyesülete III. konferenciája előadásainak és posztereinek összefoglalói. Debrecen p:125

Kiss G.B., **Csanádi G.**, Endre G., Kaló P. (1994). Első Növénynevelési Tudományos Napok. In: Heszky L. (ed.) Budapest p:125

Kiss G.B., **Csanádi Gy.**, Endre G., Kaló P. (1993). A lucerna géntérképezése IX. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Kállai L. (ed). Budapest, Kalliopé Bt.

Kiss G.B., Kaló P., Endre G., **Csanádi G.**, Felföldi K. (1994). A lucerna genetikai térképének megszerkesztése. In: X. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia. Kállai L. (ed). Budapest, Kalliopé Bt.

8.5. Könyvfejezet

C. Brummer, C.S. Echt, T.J. McCoy, K.K. Kidwell, T.C. Osborn, G.B. Kiss, **G. Csanádi**, K. Kálmán, J. Györgyey, L. Ökrész, A.E. Ráczkevy, J.H. Bouton, and G. Kochert (1993). Molecular Maps of Alfalfa. In: DNA-based Markers in Plants, Edited by I. Vasil and R. Philips, published by Kluwer Academic Publishers (Dordrecht)

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Allard R.W. (1956). Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24:235-78
- Allison L.A., Kiss G.B., Bauer P., Poirer M., Pierre M., Saviouré A., Kondorosi É., Kondorosi Á. (1993). Identification of two alfalfa early nodulin genes with homology to members of the pea *Enod12* gene family. *Plant Mol. Biol.* 21:375-80
- Appleby C.A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:443-78
- Bánfalvi Z., Sakanyan V., Koncz C., Kiss A., Dusha I., Kondorosi Á. (1981). Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184:318-25
- Bánfalvi, Z., Kondorosi É., Kondorosi Á. (1985). *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. *Plasmid* 13:129-38
- Bauer P., Crespi M.D., Szécsi J., Allison L.A., Schultze M., Ratet P., Kondorosi É., Kondorosi Á. (1994). Alfalfa ENOD12 genes are differentially regulated during nodule development by *Nod* factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol.* 105:585-92
- Bauer, W.D. (1981). The infection of legumes by rhizobia. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 32:407-49
- Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D., Brown K.L., Schmidt R., Giraudat J., Leung J., Staskawitz B.J. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860
- Bergmann H., Preddie E., Verma D.P.S. (1983). Nodulin-35: A subunit of specific uricase (uricase II) induced and localised in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J* 2:2333-2339
- Brisson N., Verma D.P.S. (1982). Soybean leghemoglobin gene family: Normal, pseudo, and truncated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4055-4059
- Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:345-82
- Carlson R.W., Kalembasa S., Tunoroski D., Packori P., Noel K.D. (1987). Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *J. Bact.* 169:4923-4928
- Carrol B.J., Mc Neill D.L., Gresshoff P.M., (1985). Isolation and properties of novel soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4162-66
- Carroll B.J., McNeill D.L., gresshoff P.M. (1985a). A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (*nts*) soybean mutant. *Plant Physiol.* 78:34-40
- Church G.M., Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-95
- Clarke H.R.G., Leigh J.A., Douglas C.J. (1992). Molecular signals in the interactions between plants and microbes. *Cell* 71:191-199

- Crespi M.D., Jurkevitch E., Poiret M., d'Aubenton-Carafa Y., Petrovics Gy., Kondorosi É., Kondorosi Á. (1994). ENOD40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* 13:5099-5112
- Csanádi Gy., Szécsi J., Kaló P., Kiss P., Endre G., Kondorosi Á., Kondorosi É. Kiss G.B. (1994). ENOD12 an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell* 6:201-213
- Davidowitz E.J., Creissen G., Vincze É., Kiss G.B., Lang-Unnash N. (1991). Sequence analysis of alfalfa (*Medicago sativa*) leghemoglobin cDNA and genomic clones. *Plant Mol. Biol.* 16:161-65
- Dazzo F.B., Hubbell D.H., (1975). Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in *Rhizobium trifolii*-clover association. *Appl. Microbiol.* 30:1017-33
- Deák M., Kiss G.B., Koncz Cs., Dudits D. (1986). Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 5:97-100
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21
- Deroche M.E., Carayol E. (1989). Some properties of legume nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol. Biochem.* 27:379-86
- Diaz C.L., Melchers L.S., Hoykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338:579-581
- Dixon R.A., Lamb C.J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-67
- Djordjevic M.A., Gabriel D.W., Rolfe B.G. (1987). *Rhizobium* - the refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:145-68
- Dudley M.E., Long S.R. (1989). A non-nodulating alfalfa displays neither root-hair curling nor early cell division in response to *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 1:65-72
- Dunn K., Dickstein R., Feinbaum R., Burnett B.K., Peterman T.K., Thoidis G., Goodman H.M., Ausubel F.M. (1988). Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:66-74
- Egli M.A., Griffith S.M., Miller S.S., Anderson M.P., Vance C.P. (1989). Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence at effective and plant gene controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol.* 91:898-904
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256:998-1000
- Estabrook E., Sengupta-Gopalan C. (1991). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *The Plant Cell* 3:299-308
- Feinberg A.P., Vogelstein B., (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13

- Firmin J.L., Wilson K.E., Rossen L., Johnston A.W.B. (1986). Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324:90-92
- Fisher R.F., Long S.R. (1992). *Rhizobium* - plant signal exchange. *Nature* 357:655-660
- Forde B.G., Cullimore J.V. (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. In: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Miflin B.J. (ed.) Oxford, Clarendon 6:247-96
- Fortin M.G., Zelechowska M., Verma D.P.S. (1985). Specific targeting of the membrane nodulins to the bacteroid enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J.* 3:3041-46
- Fortin M.G., Morrison N.A., Verma D.P.S. (1987). Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin, is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucl. Acids. Res.* 15:813-24
- Franssen H.J., Nap J.P., Gloudemans T., Stiekema W., Van Dam H., et al. (1987). Characterization of complementary DNA for nodulin-75 of soybean: a gene product involved in early stage of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4495-99
- Franssen H.J., Vijn I., Yang W.C., Bisseling T. (1992). Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* 19:89-107
- Franssen H., Yang W.C., Katinakis P., Bisseling T. (1993). Characterization of GmENOD40, a gene expressed in soybean nodule primordia. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios R., Mora J., Newton W.E. eds. pp:275-84. Kluwer, Dordrecht
- Fry S.C., Aldington S., Hetherington P.R., Aitken J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol.* 103:1-5
- Gloudemans T., Bhuvaneshwari T.V., Moerman M., van Brussel A.A.N., van Kammen A., Bisseling T. (1989). Involvement of *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes on gene expression in pea root hairs. *Plant Mol. Biol.* 12:157-67
- Govers F., Harmsen H., Heidstra R., Michielsen P., Prins M., van Kammen A., Bisseling T. (1991). Characterisation of the pea ENOD12B gene and expression analyses of the two ENOD12 genes in nodule, stem and flower tissue. *Mol. Gen. Genet.* 228:160-66
- Gray J.X. and Rolfe B.G. (1990). Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol.* 4:1425-31
- Griffith S.M., Vance C.V. (1989). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules: purification and partial characterization. *Plant Physiol.* 90:1622-29
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. (1993). *An Introduction to Genetic Analysis*. V. edition, Freeman, New York. pp:121-125
- Grosskopf E., Ha D.T.C., Wingender R., Röhrig R., Szécsi J., Kondorosi É., Kondorosi Á. (1993). Enhanced levels of chalcone synthase in alfalfa nodules induced by a Fix⁻ mutant of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:173-81

Györgypál Z., Iyer N., Kondorosi Á. (1988). Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 212:85-92

Györgypál Z., Kiss G.B., Kondorosi Á. (1991). Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium NodD* proteins. *Bioessays* 13:575-81

Hahlbrock K., Scheel D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-69

Haldane J.B.S. (1919). *J. Genet.* 8:291

Hirsch A.M., Bhuvaneshwari T.V., Torrey J.G., Bisseling T. (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:1244-48

Hirsch A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237

Hirsch A.M., Asad S., Fang Y., Wycoff K., Löbler M. (1993). Molecular interactions during nodule development. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios, R., Mora J., Newton W.E. eds. pp:291-96, Kluwer, Dordrecht

Horváth B., Kondorosi É., John M., Schmidt J., Török I., Györgypál Z., Barabás I., Wieneke U., Schell J., Kondorosi Á. (1986). Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity on alfalfa. *Cell* 46:335-43

Horváth B., Heidstra R., Lados M., Moerman M., Spaink H.P., Promé J.-C., van Kammen A., Bisseling T. (1993). Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *The Plant J.* 4:727-33

Jacobs M., Rubery P.H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241:346-49

Jacobsen E., Feenstra W.J. (1984). A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. *Plant Sci. Lett.* 33:337-344

Journet E.P., Pichon M., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Barker D.G. (1994). *Rhizobium meliloti* *Nod* factors elicit cell specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *The Plant J.* 6:241-49

Kaló P., Endre G., Csanádi G., Felföldi K., Kiss G.B. (1994). An improved linkage map of *Medicago sativa*. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference. Kiss G.B., Endre G. (eds.). Officina Press, Szeged pp:330

Kijne J.W. (1992). The *Rhizobium* infection process. In: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. eds. Chapman and Hall, New York, pp:349-98

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:11-120

Kiss G.B., Végh Z., Vincze É. (1987). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding leghemoglobin-III (LbIII) from *Medicago sativa*. *Nucl. Acids Res.* 15:3620

Kiss G.B. (1987a). A szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő lucerna gének izolálása és jellemzése. Kandidátusi disszertáció

- Kiss G.B., Vincze É., Végh Z., Tóth G., Soós J. (1990). Identification and cDNA cloning of a new nodule-specific gene, Nms-25 (nodulin-25) of *Medicago sativa*. *Plant Mol. Biol.* 14:467-75
- Kiss G.B., Csanádi G., Kálmán K., Kaló P., Ökrész L. (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Gen. Genet.* 238:129-37
- Kneen B.E., LaRue T.A., Hirsch A.M., Smith C.A., Weeden N.F. (1990). *sym-13 A* gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* 94:899-905
- Koes R.E., Quattrocchio F., Mol J.N.M. (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *Bioessays* 16:123-32
- Kondorosi É., Bánfalvi Z., Kondorosi Á. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*. Identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193:445-452
- Kondorosi Á., Kondorosi É., Dusha I., Bánfalvi Zs., Gyuris J., John M., Schmidt J., Bakos Á., Hoffmann B., Duda E., de Bruijn F., Schell. J. (1989). Factors controlling root nodule induction by *Rhizobium meliloti*. In: *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. B. J. J. Lugtenberg (ed.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg. pp:321-326
- Kondorosi Á., Kondorosi É., John M., Schmidt J., Schell J. (1991). The role of nodulation genes in bacterium-plant communication. In: *Genetic Engineering*, Vol 13., J.K. Setlow (ed.), Plenum Press, New York. pp:115-136
- Kondorosi Á., Schultze M., Györgypál Z., Dusha I., Cren M., Pierre M., Buiré M., Hoffmann B., Barlier I., Bauer P., Poiret M., Kondorosi É. (1992). Control of nodulation gene expression in *Rhizobium meliloti*. In: *DNA Transfer and Gene Expression in Microorganisms*, Intercept Ltd, Andover Hampshire. pp:157-167
- Kondorosi Á. (1992). Regulation of nodulation genes in *Rhizobia*. In: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. Verma D.P.S. (ed.), CRC Press, Boca Raton. pp:325-40
- Kondorosi Á., Cren M., Dusha I., Györgypál Z., Zuanazzi J., Coronado C., Poirier S., Ratet P., Kondorosi É. (1993). Plant signals controlling the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* In: *Trends in Microbial Ecology*, R. Guerrero, C. Pedrós-Alió (eds.), Spanish Society for Microbiology. pp:273-76
- Kouchi H., Hata S. (1993). Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* 238:106-19
- Kozik A.V., Matvienko M.A., Men A.E., Zalensky A.O., Tikhonovich I.A. (1992). Pea (*Pisum sativum*) genes involved in symbiosis with nitrogen fixing bacteria. II. Investigation of early nodulin ENOD12 gene structure for different varieties of pea by means of polymerase chain reaction. *Molekularnaya Biologia* 26:591-95
- Landau-Ellis D., Angermüller S.A., Shoemaker R., Gresshoff P.M. (1991). The genetic locus controlling supernodulation co-segregates tightly with a cloned molecular marker. *Mol. Gen. Genet.* 228:221-226

- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Larsen K., Jochimsen B.U. (1986). Expression of nodule-specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J.* 5:15-19
- Lauridsen P., Franssen H., Stougaard J., Bisseling T., Marcker K.A. (1993). Conserved regulation of the soybean early nodulin ENOD2 gene promoter in determinate and indeterminate transgenic root nodules. *The Plant Journal* 3:483-492
- Legocki R.P. and Verma D.P.S. (1980) Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell* 20:153-163
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C., Dénarié J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-84
- Lesins K.A., Lesins I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. Dr. W. Junk Publishers, The Hague. pp:90-108
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guerrier D., Chefdor F., Giraudat J. (1994). *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264:1448-1452
- Lie T.A. (1971). Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant and Soil* 31:117-127
- Long S.R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56:203-14
- Long S.R., Atkinson E.M. (1990). *Rhizobium* sweet - talking. *Nature* 344:712-13
- Löbler M., Hirsch A.M. (1993). A gene that encodes a proline-rich nodulin with limited homology to PsENOD12 is expressed in the the invasion zone of *Rhizobium meliloti*-induced alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 103:21-30
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Marcker A., Bojsen K., Jensen E.O., Paludan K. (1984). The soybean leghemoglobin genes. In: *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Veeger C., Newton W.E. eds. pp:573-78, Wageningen Nijhoff/Junk, The Hague , Netherlands
- Markwei C.M., LaRue T. (1992). Phenotypic characterization of *sym8* and *sym9*, two genes conditioning non-nodulation in *Pisum sativum* "Sparkle". *Can. J. Microbiol.* 38:548-554
- Mathews A., Carroll B.C., Bauer W.D., Gresshoff P.M. (1986). *rj6-* a new gene conditioning non-nodulation in soybean. In: *Proceedings of The Eight Australian Nitrogen Fixation Conference*. Adelaide, Australia. Wallace W., Smith S.E. (eds). Appendix 1.
- Mathews A., Carroll B.J., Gresshoff P.M. (1989). A new recessive gene conditioning non-nodulation in soybean. *J. Hered.* 80:357-60

- Mathews A., Landau-Ellis D., Carroll J.B., Morgan J.H.T., Gresshoff P.M. (1994). Linkage analysis of two non-nodulation genes in soybean (*Glycine max* L.) mutants in press
- Miao G.H., Verma D.P.S. (1993). Soybean nodulin-26 gene encoding a channel protein is expressed only in the infected cells of nodules and is regulated differently in roots of homologous and heterologous plants. *The Plant Cell* 5:781-94
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832
- Mindrinos M., Katagiri F., Yu G-L., Ausubel F. (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78:1089-1099
- Nap J.-P., Bisseling T. (1990). Developmental Biology of a Plant-Prokaryote Symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science* 250:948-54
- Newcomb W., Sippel D., Peterson R.L. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 54:2603-2616
- Ornstein L. (1964). Disc electrophoresis. II: Method and application to human serum protein. *Ann. NY Acad. Sci.* 121:404-27
- Peters N.K., Frost J.W., Long S.R. (1986). A plant flavone, luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233:977
- Peters N.K., Long S.R. (1988). Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88:396-400
- Peters N.K., Verma D.P.S. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 3:4-8
- Peterson M.A., Barnes D.K. (1981). Inheritance of ineffective nodulation and non-nodulation traits in alfalfa. *Crop. Sci.* 21:611-616
- Petrovics Gy., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T.A., Noel K.D., Carlson R.W., Kondorosi A. (1993). The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* 8:1083-1094
- Pichon M., Journet E.-P., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Barker D.G. (1992). *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *The Plant Cell* 4:1199:1211
- Putnoky P., Petrovics Gy., Kereszt A., Grosskopf E., Ha D.T.C., Bánfalvi Zs., Kondorosi A. (1990). *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* 172:5450-5458
- Quiros C.F., Bauchan G.R. (1988). The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: Hanson A.A., Barnes D.K., Hill R.R. Jr eds. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, Wis. pp:93-124
- Redmond J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323:632-633

- Rae A.L., Bonfante-Fasolo P., Brewin N.J. (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J.* 2:385-395
- Recourt K., van Tunen A., Mur L., van Brussel A., Lugtenberg B., Kijne J. (1992). Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* ssp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol. Biol.* 19:411-20
- Rédei P.Gy. (1987). *Genetika. Mezőgazdasági Kiadó-Gondolat, Budapest*
- Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Dénarié J., Promé J.C. (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67:1131-43
- Rommens J.M., Ianuzzi M.C., Kerem B.S., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidada M., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.C., Collins F.S. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065
- Rostás K., Kondorosi É., Horváth B., Simoncsits A., Kondorosi Á. (1986). Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1757-61
- Rossen L., Shearman C.A., Johnston A.W.B., Downie J.A. (1985). The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA,B,C* genes. *EMBO J.* 3369
- Roth E., Jean K., Stacey G., (1988). Homology in endosymbiotic systems: the term "symbiosome". In: Palacios R., Verma D.P.S. (eds) *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 220-225
- Saiton N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-25
- Sanchez, F., Padilla, J.E., Pérez H., Lara M. (1991). Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:507-28
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with the chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-67
- Sanger F., Coulson A.R., Barend B.G., Smith A.J.H., Roe B.A.A. (1980). Cloning in a single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143:161-78
- Savouré A., Magyar Z., Pierre M., Brown S., Schultze M., Dudits D., Kondorosi Á., Kondorosi É. (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* *Nod* signal molecules in *Medicago* microcallus suspensions. *EMBO J.* 13:1093-1102
- Scheres B., Van De Wiel C., Zalensky A., Horváth B., Spaink H., Van Eck H., Zwartkruis F., Wolters A.-M., Gloudemans T., Van Kammen A., Bisseling T. (1990a). The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60:281-94

Scheres B., van Engelen F., van der Knaap E., van de Wiel C., van Kammen A., Bisseling T. (1990b). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *The Plant Cell* 2:687-700

Scheres B., McKhann H.I., Zalensky A., Löbler M., Bisseling T., Hirsch A.M. (1992). The psENOD12 gene is expressed at two different sites in Afghanistan pea pseudonodules induced by auxin transport inhibitors. *Plant Physiol.* 100:1649-55

Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi É., Virelizier H., Glushka J.N., Endre G., Géro S.D., Kondorosi Á. (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:192-96

Schultze M., Kondorosi É., Kondorosi Á., Staehelin C., Mellor R.B., Boller T. (1993). The sulphate group on the reducing end protects *Nod* signals of *R. meliloti* against *Medicago* chitinases. In *New horizons of Nitrogen Fixation*. Palacios R., Mora J. and Newton W. eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp:159-64

Schultze M., Kondorosi É., Ratet P., Buiré M., Kondorosi Á. (1994). Cell and Molecular Biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* 156:1-75

Showalter A.M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5:9-23

Smith D.A., Banks S.W. (1986). Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry* 25:979-95

Southern (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-17

Spaink H.P., Wijffelman C.A., Pees E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328:337-340

Spaink H.P., Wienmann J., Djordjevic M.A., Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1989). Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining *NodE* protein. *EMBO J.* 8:2811-2818

Staehelin C., Schultze M., Kondorosi É., Mellor R.B., Boller T., Kondorosi Á. (1994). Structural modifications in *Rhizobium meliloti* *Nod* factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *The Plant Journal* 5:319-30

Stougaard J., Jorgensen J.-E., Christensen T., Kühle A., Marcker K.A. (1990). Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc₃* and N23 gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* 220:353-60

Szabados L., Ratet P., Grunenberg B., de Bruijn F.J. (1990). Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene 5'-upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *The Plant Cell* 2:973-86

Szczyglowski K., Boron L., Szybiak-Strozycka U., Legocki A.B. (1989). Characterization of cDNA clone coding for nodulin-45 from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Sci.* 65:87-95

Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/Technology* 7:257-264

- Truchet G., Barker D.G., Camut S., deBilly F., Vasse J., Huguet T. (1989). Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* 219:65-68
- Vallejos E.C. (1983). Enzyme activity staining. In: Tanksley S.D. Orton T.J. eds. *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp:469-516
- van Brussel A.A.N., Recourt K., Pees E., Spaink H.P., Tak T., Wijffelman C.A., Kijne J.W., Lugtenberg B.J.J. (1990) A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* 172: 5394-5401
- Vance C.P., Johnson L.E.B. (1983). Plant determined ineffective nodules in alfalfa (*Medicago sativa*): structural and biochemical comparisons. *Can. J. Bot.* 61:93-106
- Vance C.P., Gregerson R.G., Pathirana S.M., Miller S.S., Robinson D.L., Samac D.A., Gantt J.S. (1994). Biochemical and molecular dissection of nitrogen assimilation in alfalfa root nodules. *Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference.* Officina Press, Szeged pp:95
- van de Wiel C., Norris J.I.I., Bochenek B., Dickstein R., Bisseling T., et al. (1990a). Nodulin gene expression and ENOD2 localization in effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. *The Plant Cell* 2:1009-17
- van de Wiel C., Scheres B., Franssen H., van Lierop M.-J., van Lammeren A. et al. (1990b). The early nodulin transcript ENOD2 is located in nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* 9:1-7
- van Kammen A. (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2:43-45
- Vasse J., deBilly F., Truchet G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal* 4:555-66
- Végh Z., Vincze É., Kadirov R., Tóth G., Kiss G. B. (1990). The nucleotide sequence of a nodule-specific gene, Nms-25 of *Medicago sativa*: its primary evolution via exon-shuffling and retrotransposon-mediated DNA rearrangements. *Plant Mol. Biol.* 15:295-306
- Verma D.P.S., Kazazian V., Zogbi V., Bal A.K. (1978). Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell Biol.* 78:919-936
- Verma D.P.S., Stanley J., Fortin M.G., Mauro V.P., Purohit S., Morrison N. (1986). Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol. Biol.* 7:51-61
- Verma D.P.S. (1992). Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *The Plant Cell* 4:373-82
- Vijn I., das Neves L., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T., (1993). *Nod* factors and nodulation in plants. *Science* 260:1764-1765
- Ward H.M. (1887). On the tubercular swellings on the roots of *Vicia faba*. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 178:539-62

- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-35
- Wilson R.C., Long F., Maruoka E.M., Cooper J.B. (1994). A new proline rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *The Plant Cell*, in press
- Yang W.C., Katinakis P., Hendriks P., Smolders A., de Vries F., Spee J., van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. (1993). Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *The Plant J.* 3:573-85
- Yang et al. (1994). The involvement of plant genes in different steps of nodulation. *Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference*. Officina Press, Szeged pp:95
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 és pUC19 vectors. *Gene* 33:103-19
- Zaat S.A.J., van Brussel A.A.N., Tak T., Pees E., Lugtenberg B.J.J. (1987). Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *J. Bacteriol.* 169:3388-91