

**A gümőfejlődésben résztvevő *enod12*, ciklin és *msc27*
gének jellemzése és kifejeződésük vizsgálata
Medicago növényekben.**

PhD értekezés tézisei

Készítette: Szécsi Judit

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézete**

**CNRS Institut des Sciences Végétales
Gif-sur-Yvette, Franciaország**

**Témavezetők: Dr. Dudits Dénes
Dr. Kondorosi Éva**

**József Attila Tudományegyetem, Szeged
1998**

**A gümőfejlődésben résztvevő *enod12*, ciklin és *msc27*
gének jellemzése és kifejeződésük vizsgálata
Medicago növényekben.**

PhD értekezés tézisei

Készítette: Szécsi Judit

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézete**

**CNRS Institut des Sciences Végétales
Gif-sur-Yvette, Franciaország**

**Témavezetők: Dr. Dudits Dénes
Dr. Kondorosi Éva**

József Attila Tudományegyetem, Szeged

1998

Tartalomjegyzék

Rövidítések

1. Előszó.....	1
2. Bevezetés.....	2
2.1. A nitrogénkötés jelentősége és módjai. A szimbiotikus nitrogénkötés.	2
2.2. Szimbiózis a <i>Rhizobiaceae</i> baktériumcsalád tagjai és a pillangós növények között.....	4
2.3. A mikroszimbióta és a szimbiózisban résztvevő bakteriális gének.....	9
2.3.1. A nodulációs gének és a Nod faktorok.	9
2.3.2. A bakteriális poliszaharidok szerepe és szintézisükben szerepet játszó gének	13
2.3.3. A nitrogénkötésben résztvevő gének: <i>nif</i> és <i>fix</i> gének.....	14
2.4. A szimbiózisban résztvevő növényi gének.	15
2.4.1. Korai nodulin gének.	16
2.4.2. Az <i>enod12</i> korai nodulin gén.....	18
2.4.3. Késői nodulinok	20
2.5. A sejtciklus általános jellemzői és a sejtciklus reaktivációja a lucerna gyökérgümő képződése során.....	22
2.5.1. Ciklin függő kinázok.	24
2.5.2. Ciklinek.....	25
2.6. A lucerna <i>msc27</i> nevű génje.	27
2.7. Az <i>in situ</i> hibridizációs technika jelentősége.....	28
3. Célkitűzések	29
4. Anyagok és módszerek.....	30
4.1. Anyagok.....	30
4.2. Módszerek.	31
4.2.1. Tárgylemezek poli-L-lizinnel való kezelése.....	31

4.2.2. Plazmid DNS izolálása baktériumból és a DNS linearizálása az <i>in situ</i> hibridizációs próba előállításához.	31
4.2.3. <i>In situ</i> hibridizációs próba tisztítása.	32
4.2.4. Növényi összes DNS izolálása és Southern membrán készítése.	32
4.2.5. Növényi összes RNS kinyerése és Northern membrán készítése.	33
4.2.6. A hibridizációs próba jelölése és a hibridizáció.	34
4.2.7. Specifikus DNS szakaszok amplifikálása PCR reakcióban és a reverz-transzkripció.	34
4.2.8. Növények nevelése és a gümőzési kísérlet.	35
4.2.9. Acetilén redukáló képesség vizsgálata.	36
4.2.10. Lucerna sejtszuspenzió hormon és stressz kezelése.	36
5. Eredmények	36
5.1. Az <i>in situ</i> hibridizációs technika körülményeinek beállítása.	36
5.1.1. A növényi anyag fixálása és beágyazása.	36
5.1.2. Metszetek készítése és előkezelése az <i>in situ</i> hibridizációhoz.	37
5.1.3. A hibridizációs próba előállítása és az <i>in situ</i> hibridizálás.	39
5.1.4. A hibridizációs jel detektálása.	41
5.1.5. A <i>Medicago sativa</i> leghemoglobin génjének térbeli kifejeződése lucerna gyökérgümőben.	41
5.2. A <i>Medicago sativa enod12</i> korai nodulin génjének jellemzése (1. és 2. publikáció).	43
5.2.1. A <i>Msenod12</i> térbeli kifejeződésének vizsgálata lucerna gyökérgümőben.	43
5.2.2. Az <i>enod12</i> gén öröklődésének nyomon követése diploid <i>Medicago</i> fajok keresztezése során.	44
5.2.3. Az <i>enod12</i> hiányának hatása a gümőképződésre és a nitrogénkötésre.	47
5.3. Lucernából izolált ciklin gének jellemzése (3. és 4. publikáció).	51
5.3.1. A lucerna <i>CyclIIMs</i> és <i>CycSMs</i> ciklinjének összehasonlítása: szekvenciaelemzés.	51
5.3.2. A <i>CyclIIMs</i> és <i>CycSMs</i> összehasonlítása Southern és Northern hibridizációval.	52
5.4. Lucerna <i>msc27</i> génjének jellemzése (Publikáció előkészületben).	56

5.4.1. Az <i>msc27</i> gén szekvenciaelemzése.....	56
5.4.2. A lucerna <i>msc27</i> génjének vizsgálata Southern hibridizációval.....	59
5.4.3. Az <i>msc27</i> gén kifejeződésének vizsgálata növényi hormonokkal kezelt lucerna sejtszuspenzióban és lucerna különböző szerveiben.....	60
5.4.4. Az <i>msc27</i> gén térbeli kifejeződésének vizsgálata lucerna gyökérgümőben.	62
6. Megvitatás.	64
7. Összefoglalás.....	70
8. Angol nyelvű összefoglaló (Abstract).....	72
9. Köszönetnyilvánítás	76
10. Saját publikációk listája	77
10.1. Az értekezés tárgyköréhez tartozó publikációk listája.	77
10.2. Egyéb publikációk.....	77
11. Felhasznált irodalom	79

Rövidítések

BSA: bovin serum albumin

dCTP: deoxi-citozin-trifoszfát

DEPC: diethyl-pirokarbonát

DNáz: deoxi-ribonukleáz

DNS: deoxi-ribonukleinsav

dNTP: deoxi-nukleotid-trifoszfát

DTT: dithiotreitol

EDTA: etilén-diamino-tetraecetsav

MOPS: morfolino-propán-szulfonsav

PCR: polimeráz-láncreakció (polymerase-chain-reaction)

RNáz: ribonukleáz

RNS: ribonukleinsav

mRNS: hírvivô (messenger) RNS

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

Trisz: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propánediol

UV: ultraviola fénytartományba esô fény

1. Előszó

A lucerna (*Medicago sativa*) mezőgazdasági jelentőségét az állatok takarmányozásában és a vetésforgóban betöltött hagyományos szerepe alapozza meg. Az utóbbi években az emberi táplálkozásban is teret hódított és a tudományos kutatásokban is egyre növekvő szerepet tölt be.

A lucernát már 2000 éve használják a mezőgazdasági vetésforgóban, mint a talaj termőképességét javító növényt. Egy jó állapotban lévő lucerna kultúra 300kg/ha légköri nitrogént is megköthet évente a gyökérgümőiben, vele szimbiózisban élő nitrogénkötő baktériumok segítségével. Ennek nagyrésze a talajban marad és nitrogén forrásul szolgálhat a lucerna után következő növényi kultúráknak. Így a költséges, sokszor veszélyes és környezetkárosító nitrogén műtrágyázás csökkenthető olyan lucerna fajok beiktatásával a vetésforgóba, amelyek nagy mennyiségű nitrogént képesek megkötni. Ez gazdasági és környezetvédelmi szempontból is igen jelentős. Ezért a pillangós növények és a *Rhizobiaceae* család tagjai között kialakuló szimbiózis megismerése, a gyökérgümő valamint a gümőkben történő nitrogénkötés kialakulása intenzív tanulmányozás alatt áll. A nitrogénkötő szimbiózisok közül a legalaposabban tanulmányozott a *Medicago-Rhizobium meliloti* között kialakuló szimbiózis. A lucerna közeli rokona, a diploid *M. truncatula* nemzetközileg elfogadott modell-növény a szimbiózis tanulmányozására. A faj előnye, hogy önbeporzó, diploid növény, és genomjának a mérete aránylag kicsi (az *Arabidopsis*-ének 3-4-szerese), ami ideálissá teszi a genetikai, molekuláris biológiai, biokémiai, stb. kutatásokhoz (Cook és mtsai., 1997). Ez ideig több, a szimbiózis kialakításában és fenntartásában résztvevő növényi gént azonosítottak, és sor került ezek kifejeződésének időbeli és térbeli vizsgálatára a gümő kialakulása folyamán, és a gyökérgümőben. Az intenzív tanulmányozás ellenére a legtöbb szimbiózis specifikus növényi gén valódi szerepéről csak találgatások vannak. A szimbiózis valamely lépésében hibás növényi mutánsok előállítása áttörést jelenthet az ilyen gének szerepének megismerésében (Penmetsa és Cook, 1997).

A gyökérgümő kialakulása a szimbiózis során kiváló lehetőséget nyújthat a növények szervfejlődésének, és ezen belül sejtosztódási ciklusnak a tanulmányozására is. Bakteriális hatásra a pillangósok gyökerének már differenciálódott kéregsejtjei újra belépnek a sejtosztódási ciklusba, és a sorozatos osztódások eredményeként kialakul a gümőprimordium, majd a gyökérgümő. A sejtciklusnak ez az újraindulása kiváló lehetőség a sejtosztódás reaktivációjának szabályozását célzó kutatásokra. Ezeket a vizsgálatokat nagymértékben elősegíti, hogy a *Medicago sativa* az egyik legjobban tanulmányozott növény a sejtciklus vonatkozásában. Számos gént izoláltak, amelyeknek jelentős szerepük van a sejtciklus különböző szakaszainak szabályozásában (Hirt és mtsai., 1992; Kapros és mtsai., 1992; Dahl és mtsai., 1995; Meskiene és mtsai., 1995; Savouré és mtsai., 1995; Magyar és mtsai., 1997). Ezenkívül kutatások folynak a különböző hormon- és stresszhatások jelátviteli rendszerének felderítésére lucernában.

2. Bevezetés

2.1. A nitrogénkötés jelentősége és módjai. A szimbiotikus nitrogénkötés.

Az élőlények, néhány baktérium kivételével, képtelenek a szervezetük felépítéséhez szükséges nitrogént elő állítani. Világviszonylatban a termesztett növények számára a kötött nitrogén a limitáló tápanyag. A megfelelő terméseredmények eléréséhez elengedhetetlenül szükséges, hogy a növények nitrogénellátása megfelelő legyen. Az atmoszféra 78%-a nitrogén, de az élő szervezetek többsége ezt a nitrogén forrást nem képes közvetlenül hasznosítani. Ezért a légköri nitrogént előbb az élőlények számára felvehető formájú vegyületekké kell alakítani. A nitrogénkötés (nitrogénfixálás) folyamatában a légköri nitrogén (N_2) ammóniává (NH_3), majd ammónium ionná (NH_4^+) alakul, amelyet a növények képesek a számukra szükséges nitrogén tartalmú vegyületek felépítéséhez felhasználni. A légköri nitrogén megkötésének három különböző módját ismerjük:

- A fizikai nitrogén kötés során a légköri nitrogén reaktív ionokkal alakít ki kapcsolatot, elektromos kisülések hatására. Az így kialakuló nitrogén tartalmú szervesetlen molekulák a csapadékkal a talajba mosódnak és az ott élő szervezetek számára táplálékforrássul szolgálhatnak. A fizikai nitrogénkötés mértéke csekély (Hardy és Havelka, 1975).

- A kémiai nitrogénkötés ipari tevékenység, amelynek során a légköri nitrogént magas nyomáson és hőmérsékleten alakítják szervesetlen nitrogén vegyületekké. Az eljárás nagy energiafelhasználása miatt költséges.

- A biológiai nitrogénkötés a légköri nitrogén megkötésének leghatékonyabb módja. Erre csak néhány prokarióta élőlény képes. Ezek vagy önállóan (szabadon élő nitrogénkötők), vagy magasabbrendű növényekkel együttélésben (szimbiotikus és asszociatív nitrogénkötők) képesek megteremteni a nitrogénkötés feltételeit. A kötött nitrogénnek kb. 80%-a biológiai nitrogénkötésből származik; ezen belül is a szimbiózisból származó kötött nitrogén mennyisége jóval meghaladja a szabadon élő nitrogénkötők által megkötött nitrogén mennyiségét (1. táblázat).

A szimbiózis kifejezést a botanikus De Bary vezette be 1879-ben. Eleinte ezt a kifejezést használták az eltérő fajok közötti együttélés minden formájára. Azóta az eltérő fajok közötti együttélés formáit kategóriákba osztották és a szimbiózis olyan együttélést jelent két, eltérő fajhoz tartozó élőlény között, amelynek hatása mindkét fél számára kedvező. A szimbiózis különösen nagy jelentőségű a nitrogénkötésben, mivel a biológiailag fixált nitrogén legnagyobb része szimbiotikus nitrogénkötésből származik. A szimbiotikus nitrogénkötés tágabb értelmezésben azt jelenti, hogy a magasabbrendű növény kedvező feltételeket teremt a mikroorganizmus fejlődéséhez és fedezi a nitrogénkötés energiaigényét, míg a szimbióta proka-

1. táblázat

A. Néhány szabadon élő nitrogénkötő szervezet nitrogénkötésének mértéke.

Csoport	Faj	A nitrogénkötés mértéke kg N ₂ /ha/év
<u>Eurobaktériumok:</u>		
-Obligát anaerobok	<i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1
-Fakultatív anaerobok	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus polymixa</i> <i>Enterobacter agglomerans</i>	1
-Mikroaerobok	<i>Azospirillum lipoferum</i>	1
-Obligát aerobok	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Derxia gummosa</i>	1
<u>Fotoszintetizálók:</u>		
-Baktériumok	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Chlorobium limicola</i>	30-50
-Kékbaktériumok	<i>Plectonema boryanum</i> <i>Nostoc mucorum</i> <i>Anabaena cylindrica</i>	

B. Néhány szimbióta nitrogénkötő szervezet nitrogénkötésének mértéke.

Szimbioták		Gazdanövények	Nitrogénkötés mértéke kg N ₂ /ha/év
Család	Génusz		
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Medicago</i>	
	<i>Mezorhizobium I</i>	<i>Lotus</i>	10-350
	<i>Rhizobium I</i>	<i>Pea, Vicia</i>	
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Glycine</i>	20-250
	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania</i>	30-200
<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i>	<i>Alnus</i>	
		<i>Casuarina</i>	15-300
		<i>Myrica</i>	
		<i>Comptonia</i>	
<i>Cyanophyceae</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Azolla</i>	40-120
	<i>Nostoc</i>	<i>Cycas</i>	19-60
		<i>Macrozamia</i>	18
		<i>Gunnera</i>	58

rióta nitrogén tartalmú vegyületekkel látja el a gazdanövényt. A szűkebb értelmezésű szimbiózis során a nitrogénkötés folyamata egy erre a célra kialakuló új növényi szervben zajlik. A magasabbrendű növényekkel szimbiózist kialakító mikroorganizmusok három csoportba sorolhatók:

- cianobaktériumok vagy kéalgák,
- a *Rhizobiaceae* család tagjai,
- aktinomiceták.

Ezek a mikroorganizmusok a magasabbrendű növények változatos fajaival élnek együtt. Kéalgák szimbiózisa során nem alakul ki új szerv, a mikroszimbionta a növény már meglévő szármirigyeit foglalja el, és itt történik a nitrogénkötés. A másik két mikroszimbionta csoport tagjai a gazdanövényt egy új szerv, a gümő, kialakítására serkentik a szimbiózis során, amelyben légköri nitrogén vegyületekké való átalakítása történik. Mindhárom esetben a mikroszimbionta a növény sejtjein belül helyezkedik el, de egy, a gazdanövény plazmalemmájából származó membrán határolja el a növényi citoplazmától.

A szimbiózisok közül a pillangós növények és a *Rhizobiaceae* család tagjai között kialakuló szimbiózis a legjelentősebb, mind a megkötött nitrogén mennyisége szempontjából, mind mezőgazdaságilag, így ezek együttélése áll a nitrogénkötés megismerésére irányuló kutatások középpontjában. A *Rhizobiaceae* család három nemzetségének tagjai képesek a pillangós növényekkel szimbiózisban élni: a *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Azorhizobium* nemzetségbe tartozó baktériumok. Újabban két új nemzetséget különítettek el a *Rhizobiaceae* családon belül, amelyek a *Rhizobium* nemzetségből váltak ki: a *Sinorhizobium* és *Mesorhizobium* nemzetséget (Martinez-Romero and Caballero-Mellado, 1996; van Berkum and Eardly, 1998, Kiss és mtsai., nyomtatás alatt). Mivel ezek a nemzetségek újonnan kialakítottak, és a *Rhizobium* fajok átnevezése és besorolása az új nemzetségekbe folyamatos, ezen dolgozat keretein belül, a könnyebb érthetőség kedvéért, még a hagyományos baktérium neveket és besorolásokat használjuk.

2.2. Szimbiózis a *Rhizobiaceae* baktériumcsalád tagjai és a pillangós növények között.

A *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* és *Azorhizobium* nemzetségbe tartozó talajlakó baktériumok egyedi tulajdonsága, hogy pillangós növényekkel szimbiózisban élnek, amelynek során a baktériumok a gazdanövény gyökerén (illetve néhány esetben szárán) nitrogénkötő gümők kialakítását serkentik. A szimbiózis gazdaspecifikus, vagyis egy adott *Rhizobium* faj csak meghatározott növényfajokkal lép kölcsönhatásba (2. táblázat).

BAKTÉRIUM

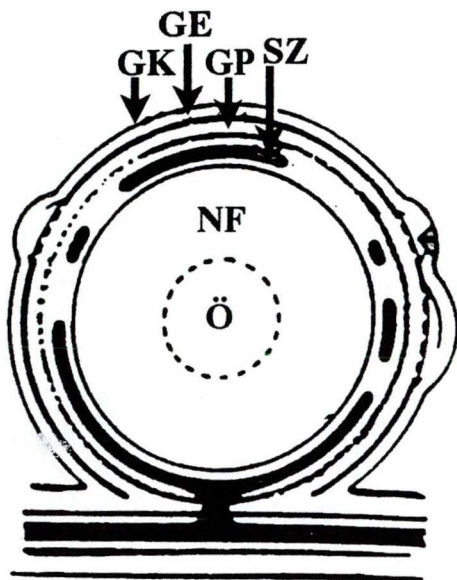
GAZDANÖVÉNY

<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus, Medicago, Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	trópusi pillangósok, <i>Parasponia</i>
<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus, Anthyllis</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia, Pisum, Lathyrus, Lens</i>
<i>Rhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Rhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium tropicii</i>	<i>Phaseolus, Leucaena, Macroptilium</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinalis, G.orientalis</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. strain <i>Parasponia</i>	<i>Parasponia</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

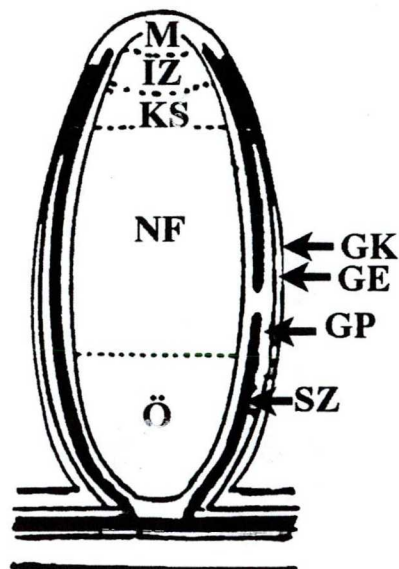
2. táblázat. Különböző *Rhizobium* fajok és gazdanövényeik.

A szimbiózis során létrejövő új növényi szerv, a gyökérgümő, amelynek pillangós növényeken két fajtáját különböztetjük meg: a determinált és az indeterminált gümőt. Ezek meghatározott és jellemző belső szerkezettel rendelkeznek (Dart, 1977; Newcomb, 1981; Hirsch, 1992; van Rhijn és Vanderleyden, 1995), amelyek az 1. ábrán láthatók. Az indeterminált gümő a mérsékelt éghajlaton élő növényeken képződik (lucerna, borsó, stb.). A gümő kialakulása a gyökér belső kéregsejtjeinek osztódásával kezdődik, a baktériumok az állandó osztódó szövet mögötti sejteket fertőzik meg. Az indeterminált gümő merisztémája heteken keresztül folyamatosan működik, így a gümő alakja elnyújtott, hosszúkas. A gümőn belül az összes különböző fejlődési állapotban lévő baktérium megtalálható az egymás mögött elhelyezkedő gümőzónákban. A determinált gümő a trópusi eredetű növényfajokra jellemző (szója, bab, stb.). Ennek kialakulása a gyökér külső kéregsejtjeinek osztódásával kezdődik. A merisztémája csak aránylag rövid ideig működik (kb. 10

napig). A baktériumok a merisztéma sejtjeit fertőzik meg és azokkal osztódnak tovább. Miután a sejtosztódás befejeződik, a gümő növekedése a sejtek megnagyobbodásával történik. A determinált gümők gömb alakúak, és bennük egy adott időpontban az összes baktérium egy meghatározott fejlődési fázisban van.



DETERMINÁLT



INDETERMINÁLT

1. ábra. A determinált és indeterminált gümők belső szerkezeti felépítése. **GK:** gümő kéreg, **GE:** gümő endodermisz; **GP:** gümő parenchima; **SZ:** szállítószövet; **M:** merisztéma; **IZ:** inváziós zóna; **KS:** korai szimbiotikus zóna; **NF:** aktív nitrogén fixáló zóna; **Ö:** öregedő fertőzött zóna.

A gümő képződése bonyolult folyamat, amely mind bakteriális, mind növényi oldalról szigorú szabályozás alatt áll az optimális gümőzési állapot kialakítása érdekében. A gyökérgümő kialakításában mind növényi, mind bakteriális oldalról több gén vesz részt. A szimbiózis során ezek a gének a partnerek közötti jelmolekulák cseréje következtében fokozatosan, meghatározott sorrendben lépnek működésbe, változások sorát idézve elő mindkét partnerben. A gümőképződéséhez és a nitrogénkötéshez szükséges jelmolekulák és gének, valamint szerepük leírásával több összefoglaló munka is foglalkozik (Long, 1989; Schultze és mtsai., 1994; Mylona és mtsi., 1995)

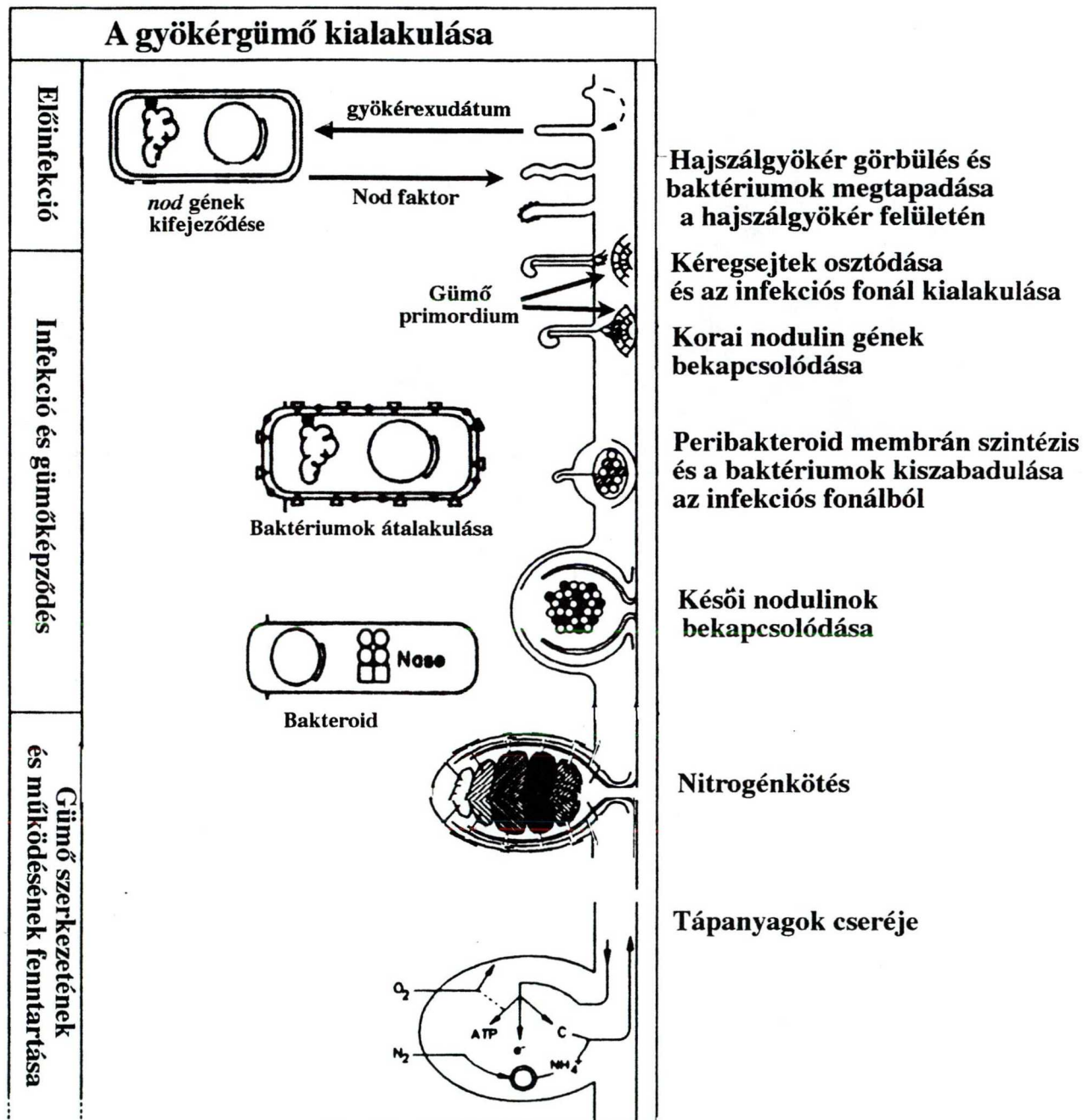
A szimbiózis kialakulásának kezdetén a növény gyökere jelmolekulákat bocsát ki a talajba. Ezek a gazdanövénytől függően különböző flavonoidok, amelyek kettős szerepet töltenek be. Egyrészt ezek a a növény által kibocsátott jelmolekulák a *Rhizobium*-ot a növényhez csalogatják (Bergman és mtsi., 1988; Caetano-Anollés és mtsi., 1988). A baktériumok egy poláris flagella, vagy a felületen elosztott 2-6 flagella segítségével mozdulnak el a talajban lévő vegyületek koncentráció gradiense mentén (kemotaxis). A kemotaxis lehet pozitív, vagyis az adott anyag koncentráció növekedése felé történő mozgás, vagy negatív, vagyis a koncentráció csökkenés

irányába való elmozdulás (lásd Götz és mtsi., 1982). Azokat az anyagokat, amelyekre a baktériumok pozitív kemotaxissal válaszolnak csalogatóknak (attraktánsok), a negatív kemotaxist kiváltóakat taszítóknak (repellensek) nevezzük. A pillangós növények gyökerének exudátuma több csalogató hatású vegyületet tartalmaz, például aminosavakat, cukrokat, stb (Currier és Strobel, 1976; Gitte és mtsi., 1978; Currier, 1980; Bowra és Dilworth, 1981; Gavorzewska és Carlile, 1982; Peters és Verma, 1990). A *Rhizobiumok* az alacsony koncentrációjú flavonoidokra pozitív kemotaxissal válaszolnak, amely valószínűleg megkönnyíti a baktérium és a gazdanövény kapcsolatteremtését (Aguilar és mtsi., 1988; Armitage és mtsi., 1988; Caetano-Anollés és mtsi., 1988; Kape és mtsi., 1991).

A flavonoidok másik, jelentősebb szerepe, hogy a baktérium pozitív szabályozó génjeinek (*nodD*) termékeihez kapcsolódva beindítják a baktérium nodulációs génjeinek (*nod*, *nol*, *noe*) működését. Ezek a gének szükségesek a bakteriális jelmolekulák (Nod faktorok) előállításához (Zaat és mtsi., 1987; Bánfalvi és Kondorosi, 1989; Baev és mtsi., 1991; Schultze és mtsai., 1994). A bakteriális Nod faktorok több fontos és párhuzamosan zajló válaszreakciót indítanak el a gazdanövény gyökerében (lásd Hardi és Bisseling, 1998). A gyökér felszínén gyors elektrofiziológiai változások érzékelhetők, például a membránok depolarizációja és a sejtek alkalinizálódása (Ehrhardt és mtsai., 1992; Kurdjian, 1995; Felle és mtsai., 1995, 1996). Ezzel egyidőben a bakteriális jelmolekulák hatására a növényi gyökérszőrök meggörbülnek, deformálódnak (Wood és Newcomb, 1989; Truchet és mtsai., 1989). A baktériumok az újonnan képződő infekciós fonálon keresztül hatolnak be a gyökérszőrbe (Callahan és Torrey, 1981). Az infekciós fonál, amelynek képződését szintén a Nod faktorok idézik elő (van Brussel és mtsai., 1992), egy növényi plazmalemma eredetű, csőszerű képződmény, amely a baktériumokat elhatárolja a növényi sejtek citoplazmájától, és amelynek segítségével a baktériumok egyre beljebb vándorolnak a gyökérszőrben, majd a kéregsejteken keresztül a kialakuló gümőprimordium felé. Szintén a bakteriális Nod faktor hatására a baktériumok behatolásával egy időben a gyökér kéregsejtjei osztódni kezdenek és kialakul a gümőprimordium (Truchet és mtsai., 1989; Yang és mtsai., 1994). A Nod faktorok ezen kívül beindítják bizonyos gümőspecifikus növényi gének (nodulinok) kifejeződését is (Horváth és mtsai., 1993; Journet és mtsai., 1994; Heidstra és mtsai., 1997). Az is bebizonyosodott, hogy a Nod faktor által beindított folyamatok nem mindig függnak egymástól, az egyik lejátszódása nem feltétele a másik bekövetkezésének. Például a korai nodulin gének kifejeződésének beindítása a hajszálgyökerek görbülése nélkül is bekövetkezik (Heidstra és mtsai., 1997). Ez azt sugallja, hogy ezen folyamatok beindítása egymástól független utakon szabályozódhat, illetve a Nod faktorok érzékelése eltérő jelátviteli rendszereken át történhet.

A gazdanövény sikeres megfertőzéséhez további bakteriális jelmolekulák szükségesek, amelyek a szimbiózistól függően különböző felszíni alkotóelemek lehetnek. A baktériumok egyre beljebb hatolnak a gyökérben és a gümőprimordiumot elérvén kiszabadulnak az infekciós fonálból és bakteroidokká fejlődnek, amelyeket növényi eredetű peribakteroid membrán vesz körül

(Robertson és mtsi., 1978). Ezután veszi kezdetét a nitrogénkötés (lásd Verma és Long, 1983). A szimbióta partnerek jelcseréjének és a gyökérgümő kialakulásának folyamatát a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra. A gyökérgümő kialakulásának folyamata *Rhizobium*-mal fertőzött *Medicago* gyökéren.

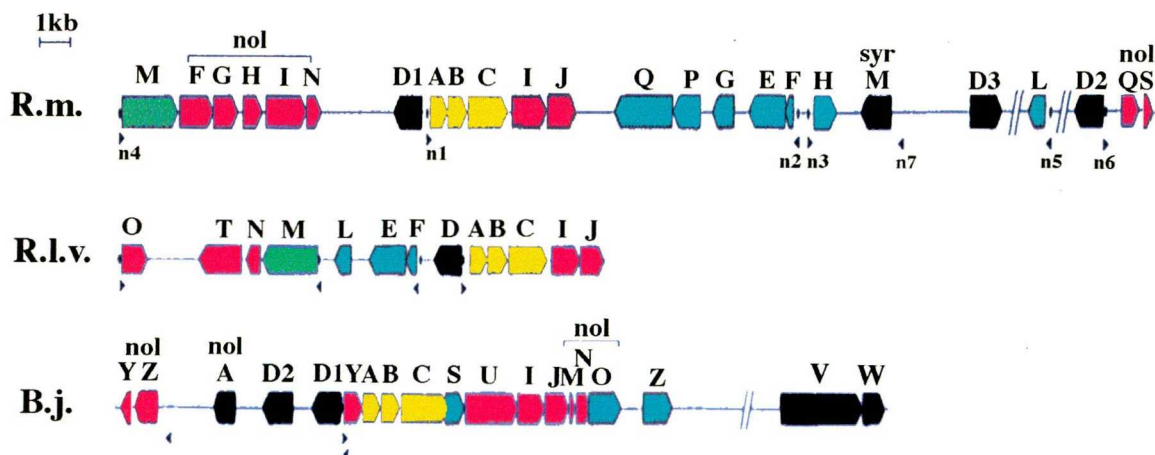
2.3. A mikroszimbionta és a szimbiózisban résztvevő bakteriális gének.

A *Rhizobiaceae* családba tartozó talajbaktériumok Gram-negatívak és obligát aerobok. Jellemző rájuk, hogy a bakteriális kromoszómán kívül egy vagy több, nagy méretű plazmidot hordoznak. Ezek mérete a kromoszóma 1/3-át is kiteheti. Ezek közül azokat, amelyek a szimbiózisban közvetlenül résztvevő géneket hordozzák szimbiotikus megaplazmidoknak nevezzük (pSym). A szimbiotikus megaplazmidok mellett olyan nagyméretű plazmidok is megtalálhatók a *Rhizobium*-okban, amelyek nem hordoznak a szimbiózisban közvetlenül résztvevő géneket. Ezen gének szerepe a baktériumokban változó, és bizonyos gének a szimbiózisra is hatással vannak (Mercado-Blanco és Toro, 1996). *Bradyrhizobium* és *Azorhizobium* esetében az összes szimbiózisban résztvevő gén a baktérium kromoszómáján helyezkedik el (Kondorosi, 1992; Long, 1992). *Rhizobium* esetében a szimbiózishoz szükséges gének egy része szintén a kromoszómán található, de túlnyomó többségük a baktériumok szimbiotikus megaplazmidjain helyezkedik el (Hynes és mtsai., 1986). *R. meliloti*-ban két szimbiotikus megaplazmidot mutattak ki (Burkardt és Burkardt, 1984; Bánfalvi és mtsai., 1985; Burkardt és mtsai., 1987). A gümőképzéshez és a nitrogénkötéshez szükséges gének többsége a pSyma plazmidon található, míg az exopoliszaharidok és lipopoliszaharidok szintézisében résztvevő gének a pSymb megaplazmidon helyezkednek el.

2.3.1. A nodulációs gének és a Nod faktorok.

A nodulációs (*nod*, *nol*, *noe*) gének a gümőfejlődés kezdetén játszanak szerepet. Ezek a gének felelősek a Nod faktorok szintéziséért. A nodulációs gének szerepük és konzerválódásuk alapján három csoportba sorolhatók, úgymint közös, gazdaspecifikus és szabályozó nodulációs gének. Ezek a gének általában csoportosan, operonokba rendeződve találhatók a baktérium megaplazmidján, illetve kromoszómáján (3. ábra). Az operonokba rendeződött *nod* gének promóter régiójában találhatók az ún. *nod* box szekvenciák, amelyek irányultsága a *nod* gének irányultságával megegyező. Ezek a szekvenciák felelősek a nodulációs gének koordinált kifejeződéséért valamennyi *Rhizobium* fajban (Fisher és Long, 1989; Goethals és mtsai., 1992; Cren és mtsai., 1995). A *nod* box két részből áll, és mindkét darabja elengedhetetlenül szükséges a NodD aktivátor fehérje kötődéséhez (Fisher és Long, 1993; Kondorosi és mtsai., 1989). A *R. meliloti* esetében a *nod* box hét kópiában található meg a *nod* régióban (Rostás és mtsai., 1986; Barnett és mtsai., 1996). *Rhizobium/Shinorhizobium* fajokban közös *nod* gének promóterjében a *nod* box után 2-14bp távolságban található egy szekvencia, ami a NolR represszor kötődéséért és a közös *nod* gének negatív szabályozásáért felelős (Kiss és mtsai., nyomtatás alatt).

A közös (common) *nod* gének (*nodABC*) minden *Rhizobium* fajban megtalálhatók és a



3. ábra. *Rhizobium meliloti* (R.m.) *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (R.l.v.) és *Bradyrhizobium japonicum* (B.j.) nodulációs génjeinek elhelyezkedése a szimbiotikus megaplazmidon (R.m. és R.l.v.), illetve a bakteriális kromoszómán (B.j.). Nyilak jelölik a különböző *nod* gének elhelyezkedését és irányultságát. **Zöld:** a prekursor molekula termelésében szerepet játszó nodulációs gének; **sárga:** közös nodulációs gének; **kék:** gazdasziszifikus nodulációs gének; **fekete:** szabályozó nodulációs gének; **piros:** azok a *nod* gének, amelyek szerepe még nem teljesen tisztázott. A fekete nyílhegyek a géneket jelképező színes nyilak alatt a *nod* box szekvenciák helyét és irányultságát jelölik. Schultze és mtsai., 1994; Schlaman és mtsai., 1998.

különböző fajok *nodABC* génjei egymással funkcionálisan kicserélhetők (Kondorosi és mtsi., 1984; Fisher és mtsi., 1985; Marvel és mtsi., 1985). A közös *nod* gének elengedhetetlenül szükségesek a gümő kialakításához. Közülük bármelyik mutációja *Nod⁻* fenotípust okoz, vagyis nem képződik gümő. A mutáció hatása megszüntethető más *Rhizobium* fajból származó azonos *nod* gén működtetésével. A *nodABC* gének a legtöbb baktérium esetében egy operonba rendeződve találhatók (3. ábra). A közös *nodABC* gének a Nod faktorok alapszerkezetének felépítésében vesznek részt. Újabban kimutatták, hogy bár szerepük azonos a különböző *Rhizobium* fajokban, mégis bizonyos esetekben a közös *nodABC* gének is szerepet játszhatnak a szimbiózis gazdasziszifikusságának kialakításában (Roche és mtsai., 1996).

A gazdasziszifikus *nod* gének a felelősek azért, hogy az adott mikroszimbionta csak a saját gazdanövényét fertőzze meg (Horváth és mtsi., 1986; Bánfalvi és Kondorosi, 1989). A különböző fajokból származó gazdasziszifikus *nod* gének általában nem, vagy csak szűk körben helyettesítik egymást. Mutációjuk késleltetett vagy hibás gümőfejlődésben nyilvánul meg, illetve a baktérium gazdasziszifikitásának megváltozásával jár (Djordjevic és mtsi., 1985; Debelle és mtsi., 1986; Horváth és mtsi., 1986). Egyes baktérium fajokban ezek a gének a *nodABC* génekkel közös operonba rendeződve találhatók és együtt szabályozódnak. A gazdasziszifikus *nod* gének felelősek a Nod faktorok lipooligosaccharid alapvázának gazdasziszifikus módosításáért.

A *nodD* pozitív szabályozó gén változó kópia számban, de a *Rhizobiaceae* család minden olyan tagjában megtalálható, amely szimbiózisra képes. Ez az egyetlen olyan *nod* gén,

amelynek kifejeződése nem korlátozódik a szimbiózisra: a szabadon élő *Rhizobium*ban is megnyilvánul, de nem aktív. Bár a NodD fehérje mind a flavonoid jelenlétében, mind a hiányában kapcsolódik a *nod* box-hoz, az aktiváló flavonoidok hiányában nem indítja be a *nod* gének átíródását (Peters és mtsi., 1986; Kondorosi és mtsai., 1989). A flavonoiddal kapcsolódott NodD-nek transzkripciós szabályozó szerepe van, és a *nod* gének átíródását szabályozza (Fisher és Long, 1992). *R. meliloti*-ból eddig három *nodD* gént azonosítottak (Göttfer és mtsai., 1986; Honma és Ausubel, 1987), míg *B. japonicum*-ból kettőt (Appelbaum és mtsi., 1988; Göttfert és mtsi., 1992) és *R. leguminosarum* bv. *viciae* esetében mindössze egyet (Rossen és mtsi., 1985). A NodD fehérjék a bakteriális szabályozó fehérjék LysR családjához tartoznak (Henikoff és mtsi., 1988; Schell, 1993). N-terminális végük erősen konzervált, ezzel a részükkel kapcsolódnak a *nod* box szekvenciához. A C-terminális szakasz változékonnyabb és homológiát mutat állati szteroid hormon receptorok ligandum-kötő részével (Györgypál és Kondorosi, 1991). Ez a rész jelentős szerepet tölt be a gazdaspecifikus szimbiózis kialakításában, így feltételezik, hogy ehhez a részhez közvetlenül kapcsolódnak a különböző növényi flavonoidok (Horváth és mtsai., 1987; Spaink és mtsi., 1987; Györgypál és mtsi., 1988, 1991).

R. meliloti-ban a *nodD*-hez hasonló *syrM* gén is résztvesz a *nod* gének szabályozásában. A gén egy olyan szabályozó fehérje termeléséért felelős, amely szintén pozitívan befolyásolja a *nod* gének működését (Mulligan és Long, 1989; Kondorosi és mtsi., 1991b). A SyrM hasonlóságot mutat a NodD fehérjékkel, és így ez a pozitív szabályozó fehérje is a LysR-típusú szabályozó fehérjék családjának a tagja (Barnett és Long, 1990;).

A *R. meliloti* 41 törzs esetében mindhárom *nodD* gén, de nem a *syrM*, a *NolR* negatív szabályozása alatt áll (Kondorosi és mtsi., 1989). A *nolR* represszor gén egy kópiában található meg a *R. meliloti* kromoszómáján (Kondorosi és mtsi., 1991a). A kódolt fehérje HTH DNS kötő motívumot tartalmaz és homológiát mutat több, kisméretű szabályozó fehérjéhez az ArsR családból (Kiss és mtsi., nyomtatás alatt). A *NolR* dimerként működik és negatívan szabályozza önmagát, valamint a Nod faktorok alapszerkezetének kialakításában résztvevő nodulációs géneket (Cren és mtsai., 1995). Érdekes, hogy a *NolR* kötő motívum nem található meg az *n2*, *n3* és *n5* *nod* box-ok előtt, amelyek a gazdaspecifikus *nod* gének átírását szabályozzák. Ez a szabályozási mechanizmus biztosítja, hogy a *Rhizobium* csak a szimbiózis kialakításához szükséges kis mennyiségben termelje a Nod faktorokat, viszont ezen belül nagyobb arányban legyenek az olyan jelmolekulák, amelyek az összes, a gazdaspecifitáshoz szükséges módosító csoportot tartalmazzák. A *NolR* gátló hatása a *nod* gének transzkripciójára nem figyelhető meg a másik általánosan használt *R. meliloti* törzs, a 1021 esetében. Ebben a törzsben a *nolR* génben egy inszerciós pontmutáció történt, amely megváltoztatta a fehérje aminosav szekvenciáját, így az elvesztette DNS kötő képességét (Cren és mtsi., 1994). Legújabb kutatások kimutatták a *nolR* jelenlétét a *Rhizobium* nemzetségen belül újabban kialakított *Sinorhizobium* és *Rhizobium* taxonómiai csoportok több tagjában (Kiss és mtsai., nyomtatás alatt).

A különböző *nod* gének összehangolt működésének eredménye a bakteriális jelmolekulák, a Nod faktorok termelése, amelyek kulcs szerepet játszanak a gümőképződés beindításában és kezdeti lépéseiben. A Nod faktorok kis molekula súlyú vegyületek, hőstabilak és többnyire erősen hidrofóbok (Schmidt és mtsi., 1988). Különböző baktériumok Nod faktora azonos, illetve hasonló alapszerkezetűek, de eltérő módosításokat tartalmaznak. Még egy fajon belül is egyszer-re több fajta Nod faktor szintézise történik. Általánosságban a Nod faktorok alapját egy négy-öt egységből felépülő, β -1,4-kötéssel kapcsolódó N-acetilglükózamin molekula alkotja, amelynek nem redukáló végéhez egy zsírsav kapcsolódik. Emellett az alapváz mindkét vég-cukorjához további módosító csoportok kapcsolódhatnak, amelyek az adott *Rhizobium* fajtól függenek, és a funkció szempontjából lényegesek. Ezek a csoportok biztosítják a Nod faktorok gazdaspecifitását. Az első Nod faktort *Rhizobium meliloti*-ből izolálták és jellemezték. Ez egy négy alegységből felépülő β -1,4-N-acetil-D-glükózamin, amely a nem redukáló végén egy kétszeresen telítetlen zsírsavat hordoz, míg a redukáló végéhez egy szulfát csoport kapcsolódik. A jelenleg használatos nomenklatura alapján a jele: NodRm-IV(S) (Lerouge és mtsi., 1990; Roche és mtsi., 1991a, b). Később *R. meliloti*-ből más Nod faktorokat is izoláltak, köztük az első Nod faktor egy változatát, amely a nem redukáló végén egy O-acetil csoportot is tartalmaz (NodRm-IV(Ac,S), valamint olyan egyéb Nod faktorokat, amelyek az alapváz hosszában, illetve a nem redukáló véghez kapcsolódó zsírsavak hosszában és telítettségében térnek el az elsőként jellemzett *R. meliloti* Nod faktortól (Schultze és mtsi., 1992; Demont és mtsi., 1994). Ma már számos más *Rhizobium* faj Nod faktorának a felépítése ismert. Ezek között a legszembevetőbb különbség a β -1,4-N-acetil-D-glükózamin alegységek számában, a nem redukáló véghez kapcsolódó zsírsavak hosszában és telítettségében, valamint a vég-cukrok módosításában van (Price és mtsai., 1992; Spaink, 1992; Dénarié és Cullimore, 1993; Carlson és mtsi., 1995).

A tisztított Nod faktor nagyon kis koncentrációban is aktív. Kimutatták, hogy nitrogén forrás hiányában már 10^{-12} M mennyiségben hajszálgökér deformálódást okoz a gazdanövényen (Lerouge és mtsi., 1990; Price és mtsi., 1992; Schultze és mtsi., 1992; Heidstra és mtsi., 1994). Egyes *M. sativa* fajták esetében a tisztított Nod faktor elegendő a gümőszerkezet kialakításához. Ezek a gümők a vad típusú gümöktől abban különböznek, hogy nem tartalmaznak bakteroidokat és így a szimbiotikus zónájuk is hiányzik, ezért üres gümőknek nevezzük őket (Truchet és mtsi., 1991; Stokkermans és Peters, 1994).

Egyenlőre még tisztázatlan, hogy a növény hogyan érzékeli a Nod faktorokat és szerkezetük különböző változásait, illetve a Nod faktorok hogyan képesek változásokat elindítani a növényben (sejtosztódás, korai nodulinok kifejeződése, stb.). A Nod faktorok szigorú szerkezeti meghatározottsága alapján, amely szerepük betöltéséhez elengedhetetlenül szükséges, feltételezik, hogy egy, vagy több receptor közreműködik az érzékelésükben a szim-biózis során (Ardourel és mtsi., 1994; Mylona és mtsi., 1995), azonban az eddigi erőfeszítések a receptor azonosítására sikertelenek voltak. Az érzékelés után a Nod faktorok feltehetően egy specifikus jelátviteli rendszer segítségével megváltoztatja a gyökérben a hormonok összetételét, ami a gümő

primordium kialakulásához vezet (Hirsch és Fang, 1994). Újabb eredmények azt mutatják, hogy a Nod faktorok elsődlegesen a G proteinek által közvetített jelátviteli rendszeren keresztül fejtik ki hatásukat, majd a jel a foszfo-inozitid, és a Ca^{+} által közvetített másodlagos jelátviteli rendszerek útján jut tovább (Pingret és mtsai., 1998).

2.3.2. A bakteriális poliszaharidok szerepe és szintézisükben szerepet játszó gének

Mint a Gram negatív baktériumoknak általában, a *Rhizobiaceae* család tagjainak külső burka is összetett. A citoplazmát körülvevő szimmetrikus belső membránt az asszimmetrikus külső membrán öleli körül; közöttük található a citoplazmatikus tér. A külső membrán felépítésében vesznek részt a bakteriális poliszaharidok, amelyeknek a következő fajtáit különböztetjük meg (lásd Carlson, 1982; Niehaus és Becker, 1998):

- exopoliszaharidok (EPS),
- lipopoliszaharidok (LPS),
- semleges B-1,2-glukánok,
- a kapszuláris poliszaharidok (CPS).

A savas exopoliszaharidok (EPS) nem kapcsolódnak szorosan a sejtek külső membránjához, hanem kiválasztódnak a baktérium környezetébe. *R. meliloti* törzsekben az exopoliszaharidoknak két nagy csoportja termelődik, az EPS I, amely egy szukcinoglükán és az EPS II, amely egy galaktoglükán alegységekből felépülő poliszaharid (Aman és mtsi., 1981; Her és mtsi., 1990; Levery és mtsi., 1991). Mindkettőnek van alacsony és magas molekulásúlyú változata. Az EPSI/EPSII termelési aránya, valamint azok minősége elsődlegesen a baktérium törzstől függő (Putnoki és mtsai., 1988), és a környezeti tényezők befolyásolják (Zhan és mtsai., 1991; Zevenhuizen és Faleschini, 1991). Az exopoliszaharidok szintézise mind transzkripcionálisan, mind poszttranszlacionálisan szabályozott folyamat (Leigh és Coplin, 1992). Az EPS termelésében résztvevő enzimeket az *exo* gének kódolják. Ezek nagy része *R. meliloti* esetében a *pSymb* megaplazmidon található, míg a többi a kromoszómán helyezkedik el (Finan és mtsi., 1986; Hynes és mtsi., 1986; lásd, Niehaus és Becker, 1998). Az *exo* gének mutációjának hatása az adott baktérium törzstől függ; legjellemzőbb tünetek, hogy a hajszálgömbök görbülése késik (Finan és mtsi., 1985; Müller és mtsi., 1988), valamint az infekciós fonál nem hatol be a gümőkbe és abortál (Yang, 1992). A képződött gümők bakteroidot nem tartalmaznak. Az EPS termelésben hibás baktérium törzsek kívülről adagolt EPS jelenlétében képesek vad típusú gümők képződését serkenteni a gazdanövény gyökerén (Klein és mtsai., 1988; Kapp és mtsai., 1990).

A lipopoliszaharidok kívülről kapcsolódnak a baktériumok külső membránjához. Szerepük az olyan pillangós növények szimbiózisa esetében jelentősebb, amelyeken determinált gümők képződnek (Hotter és Scott, 1991; Stacey és mtsai., 1991). A lipopoliszaharidok szerkezete igen

változatos. Lipid részük kapcsolódik a bakteriális membránhoz. Ez a rész 14-18 szénatomszámú, telített zsírsavakból áll, de ennél jóval hosszabb zsírsavakat is kimutattak bizonyos *Rhizobium* fajok LPS-ében (Bhat és mtsai., 1994). A lipid részhez kapcsolódik az oligoszaharid mag, majd ehhez kapcsolódik az úgynevezett O-antigén (Carrion és mtsai., 1990; Russa és mtsai., 1996). Az LPS előállításához szükséges enzimek génjei még csak nagy vonalakban ismertek. A *R. meliloti* *exoB* és *exoC* génjeiről kimutatták, hogy mind az EPS, mind a LPS előállításában részt vesznek (Leigh és Lee, 1988). Az LPS mutáció hatása a szintén az adott bakteriális törzstől függ. Bizonyos esetekben nem képződik infekciós fonál, vagy a baktériumok nem szabadulnak ki az infekciós fonálból, míg más szimbiózisokra semmilyen hatása nincs az LPS mutációnak (lásd Niehaus és Becker, 1998). Általánosságban leszögezhető, hogy az adott pillangós növény-*Rhizobium* kombinációtól függ, hogy az EPS illetve LPS milyen szerepet játszik a szimbiózis kialakításában (Putnoky és mtsai., 1990; Parnishke és mtsai., 1994; Lopez-Lara és mtsai., 1995; Niehaus és Becker, 1998).

A β -1,2-ciklikus glukánok kis molekula súlyú, semleges glukánok, amelyek valószínűleg az ozmótikus alkalmazkodásban játszanak szerepet (Miller és mtsi., 1986). A szintézisükért felelős gének (*ndv*) a kromoszómán találhatók; mutációjuk esetén a baktériumok képtelenek a fertőzésre, mivel az infekciós fonál korán abortál, és a baktériumok nem jutnak be a gyökérgümőbe (Dylan és mtsi., 1986).

A Gram negatív baktériumok külső felületéhez gyakran kapcsolódnak kapszuláris poliszaharidok (CPS), amelyek mintegy beburkolják a sejtet (Boulnois és Jann, 1989). A CPS poliszaharidok egy alcsoportját alkotják az olyan poliszaharidok, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak keto-deoxy-oktulánt, vagy annak változatát (KPS-ek). Ezt a poliszaharidot elsőként *R. meliloti* AK631-es törzséből mutatták ki. Ez a törzs nem termel EPS-t, és más *Rhizobium* törzsek EPS mutációival ellentétben mégis képes nitrogénköthő gümő indukálására a KPS segítségével (Putnoky és mtsai., 1990; Petrovics és mtsai., 1993). A KPS-ek szerkezeti homológiát mutatnak az *Escherichia coli*-ből jellemzett K-antigének csoportjával (Jann és Jann, 1990; Reuhs és mtsai., 1993).

2.3.3. A nitrogénkötésben résztvevő gének: *nif* és *fix* gének.

A nitrogénkötés folyamatában résztvevő bakteriális géneket két csoportba osztjuk. Az egyik csoportba tartoznak azok a gének, amelyek homológiát mutatnak a szabadon élő nitrogénköthő baktérium, a *Klebsiella* nitrogén fixáló rendszerének génjeivel. Ezeket *nif* géneknek nevezzük. A másik csoportba tartoznak azok, amelyek ilyen homológiát nem mutatnak, mégis szükségesek a nitrogénkötéshez a szimbiózis folyamán. Ezeket *fix* géneknek nevezzük. A *R. meliloti* *nif* és *fix* génjei csoportosan elszórva találhatók meg a pSyma megaplazmidon; a *Bradyrhizobium* hasonló génjei a kromoszómán vannak.

A *nif* gének nagy része a nitrogénkötésben szerepet játszó enzimek különböző részeinek szintéziséért felelős. Így például a *nifH* a nitrogenáz enzim homodimer vas-fehérjéjét kódolja, a

nifD és *nifK* a tetramer vas-molibdén fehérjét, míg a *nifNEB* az enzim aktivitásához szükséges vas-molibdén kofaktor (FeMoco) előállításában játszik szerepet. Egyes *fix* gének terméke bakteriális ferredoxinokhoz és egyéb fém-kötő fehérjékhez hasonlít. A nitrogénáz enzim nagy energia igényű és erősen oxigén-érzékeny enzim. Ezért a nitrogénkötő baktériumokban a *nif* gének működését a talajban lévő nitrogén vegyületek, valamint a külső oxigén koncentrációja is befolyásolják (Soupene és mtsi, 1995). A nitrogénkötés csak a növény számára felvehető nitrogén hiányában indul be. A *nif* és *fix* gének szabályozása *Rhizobium*-ban bonyolult folyamat (Gussin és mtsi, 1986; Merrick, 1992; Fischer, 1994). *R. meliloti* esetében a *Klebsiella*-hoz hasonlóan a *nif* és *fix* gének aktiválása a szimbiózis során a *nifA*-tól és az *ntrA*-tól függ (Szeto és mtsi, 1987; Morett és Buck, 1989). Magának a *nifA*-nak a kifejeződését a gümő belsejében lévő oxigén szint befolyásolja (Ditta és mtsi, 1987; Beynon és mtsi, 1988). Egyrészt maga is oxigén érzékeny (Krey és mtsi, 1992), másrészt két közvetítő *fix* gén, a *fixL* és *fixJ* szabályozása alatt áll (David és mtsi, 1988; Virts, és mtsi, 1988). Ezenkívül működik egy párhuzamos szabályozó rendszer is, amelyben a *fixJ* és *fixL* egy másik gént, a *fixK*-t aktiválja. Ezután a FixK-NtrA komplex kapcsolja be a további *nif* és *fix* géneket (Batut és mtsi, 1989). A *fixJ* és *fixL* gén szekvenciája alapján a két-komponensű szabályozó rendszerekhez mutat hasonlóságot (Nixon és mtsi, 1986; David és mtsi, 1988). A FixL érzékeli az oxigén szint változását a gümőben és foszforiláció útján aktiválja a FixJ-t alacsony oxigén koncentráció esetén (David és mtsi, 1988; Gilles-Gonzales és mtsi, 1991; Da Re és mtsi, 1994). Ezután az aktivált FixJ kapcsolja be a *nifA* és *fixK* átíródását.

2.4. A szimbiózisban résztvevő növényi gének.

Bizonyos *M. sativa* genotípusokban (nar^+) nitrogén hiányában a gümőfejlődés a baktérium jelenléte nélkül is beindul (Truchet és mtsi., 1989; Caetano-Anollés és Gresshoff, 1991; Huguet és mtsi., 1993). Ezek a spontán gümők természetesen bakteroidot nem tartalmaz (üres gümő). Szerkezetük hasonló a vad típusú nitrogénkötő gümőkéhez (Joshi és mtsi., 1991). Ez azt mutatja, hogy minden olyan lépésben, amely a gümő szerkezetének kialakulásával kapcsolatos, növényi gének működnek közre.

A gyökérgümő képződése és működése során több növényi gén is szerepet játszik. Ezek közül azokat, amelyek a fertőzetlen gyökérben nem nyilvánulnak, csak a gümőfejlődés során indukálódnak, nodulinoknak nevezzük (Legocki és Verma, 1980; Van Kammen, 1984). Az első nodulin géneket fehérjék kétdimenziós gélelektroforézisével észlelték. Ezzel a módszerrel hasonlították össze kezeletlen és *Rhizobium*mal kezelt gyökérszőrök fehérjéit. Azt tapasztalták, hogy a baktériummal kezelt gyökérszőrökben új fehérjék temelődnek (Legocki és Verma, 1980; Gloudemans és mtsi., 1987; Krause és Broughton, 1992). A nodulinokat két csoportba soroljuk az alapján, hogy a gümőfejlődés melyik szakaszában lépnek működésbe (Verma és mtsi, 1986; Nap

és Bisseling, 1990). A korai nodulinoknak (*enod*: early nodulins) a baktériummal való fertőzés, illetve a gümőképződés kezdeti szakaszában van jelentős szerepük. A késői nodulinok a kifejlődött gümőben fejeződnek ki a nitrogénkötés alatt, vagy közvetlenül előtte.

Ma már az érzékenyebb technikák révén nyilvánvaló, hogy több gümőspecifikusnak tartott gén megnyilvánul nem-szimbiotikus növényi szövetekben, sőt olyan növényekben is, amelyek nem élnek szimbiózisban, pl. leghemoglobin *Hordeumban*, *Triticumban* és *Zeaban* (lásd Andersson és mtsai., 1996). Ezek a felfedezések arra a feltételezésre vezettek, hogy a gümőspecifikus gének kialakulásánál bizonyos, nem-gümőspecifikus gének megkettőződése, majd specializálódása játszott közre (Bogusz és mtsai., 1988; Andersson és mtsai., 1996).

2.4.1. Korai nodulin gének.

A korai nodulin gének kifejeződése a szimbiózis kialakítása kezdetén indul be. Bizonyos *enod* gének bekapcsolásához nincs is szükség a baktériummal való közvetlen érintkezésre, a Nod faktorok is képesek kifejeződésüket beindítani (pl. *enod5*, *enod12*). Ezek a gének a baktériummal, illetve Nod faktorral való kezelést követően rövid időn (néhány órán) belül megkezdik működésüket (Horváth és mtsi., 1993; Journet és mtsi., 1994). Más korai nodulinok csak későbbi fázisokban kapcsolódnak be a szimbiózis folyamatába. Néhány nodulin gén kifejeződését a növényi hormonok is befolyásolják. Így például auxin szállítást gátló anyagok, különös képpen a citokinin, képesek beindítani bizonyos korai nodulin gének kifejeződését (Hirsch és mtsi., 1989).

Az ebben a dolgozatban bemutatott munka kezdetekor mindössze 5-7 korai nodulin gén volt csak ismert. Azóta jóval több új gén jellemzésére került sor (lásd, Nap és Bisseling, 1990; Hirsch, 1992; Mylona és mtsi., 1995; Munoz és mtsai., 1996), és számuk rohamosan növekszik (Gamas és mtsai., 1996). A legtöbb korai nodulin gént gümő és gyökér cDNS könyvtárak differenciál hibridizációjával, valamint a már ismert génszekvenciákhoz való hasonlóságuk alapján izolálták. A korai nodulin gének jellemzése főleg a szekvenciájuk bemutatására, valamint időbeli és térbeli kifejeződésük összehasonlítására terjed ki (lásd alább). A korai nodulinok intenzív tanulmányozása ellenére pontos szerepük nagyrészt ismeretlen. Feltételezik, hogy a baktérium fertőzésben, illetve gümőképződésben játszanak szerepet. Szekvencia hasonlóság, illetve a gümőbeli kifejeződésük alapján több feltételezés is van arra, hogy egyes korai nodulinok milyen szerepet tölthetnek be a gümőképződés során. Néhányukról például prolinban, illetve glicinben gazdag fehérjékhez való hasonlóságuk alapján feltételezik, hogy a sejtfalak felépítésében játszanak szerepet a gümőképződés korai szakaszában. A következő felsorolás áttekintést ad a korai nodulin gének csoportjairól és feltételezett szerepükről, a teljesség igénye nélkül.

Az elsőként azonosított korai nodulin gének között van a borsó *N40* nevű génje (Govers és mtsi., 1985), az *Nvs40* gén *Vicia sativa*-ból (Moerman és mtsi., 1987), valamint az *Nms30* *M. sativa*-ból (Dickstein és mtsi., 1988). Ezek valószínűleg azonos gének különböző fajokban előforduló formái, amelyek feltehetően a fertőzött és nem fertőzött sejtek differenciálódásakor játsza-

nak szerepet (Munoz és mtsai., 1996)

Igen korán azonosították az *enod2* gént is, amely egy késői korai nodulin gén, vagyis a fertőzés későbbi szakaszában, de még a nitrogénkötés megkezdése előtt kapcsolódik be. Szekvenciája alapján homológiát mutat a hidroxiprolinban gazdag proteinekhez, és így feltételezik, hogy az Enod2 egy, a sejttal felépítésében részt vevő fehérje (Franssen és mtsai., 1987). Kifejeződését a gümő alapi részén, valamint a belső kéreg sejtekben figyelték meg (Van de Wiel és mtsi., 1990 a,b; Allen és mtsi., 1991). Feltételezik, hogy a nitrogénkötéshez szükséges oxigén sorompó felépítésében, illetve rövid távú szabályozásában játszik szerepet (Witty és mtsi., 1987; Wycoff és mtsai., 1998). A gén több pillangós növényfajban is megtalálható, úgymint szójában (Franssen és mtsi., 1987), borsóban (Van de Wiel és mtsi., 1990a), *Sesbania rostrata*-ban (Strittmatter és mtsi., 1989), lucernában (Dickstein és mtsi., 1988) valamint lupinban (Szczyglowski és Legocki, 1990). Az *enod2* érdekessége, hogy kifejeződése a fertőzés folyamától független; működését kimutatták üres gümőkben, spontán gümőkben és auxin szállítást gátló anyagokkal indukált gümőkben is (Dickstein és mtsi., 1988; Hirsch és mtsi., 1989; Truchet és mtsi., 1989; Van de Wiel és mtsi., 1990b; Dehio és de Bruijn, 1992).

Az *enod3* és *enod14* két borsóból származó késői korai nodulin, amelyek kifejeződése borsó gyökérgümőkben azonos mintát mutat. Kifejeződésük akkor indul be, amikor az *enod12* gén kifejeződése megszűnik, és még a nitrogénkötés megkezdése előtt befejeződik. Csak *Rhizobium*-mal fertőzött sejtekben mutatható ki a jelenlétük (Scheres és mtsai., 1990b).

Az *enod5* gén egy 14kDa nagyságú fehérjét kódol és elsőként borsóból (Scheres és mtsai., 1990b), később babból is (Vijn és mtsai., 1995b) azonosították. A feltételezett fehérje nagy mennyiségben tartalmaz prolint, glicint, alanint és szerint, ami alapján feltételezik, hogy az arabinogalaktánokhoz-hasonló fehérjék családjába tartozik, amelyekről kimutatták, hogy a plazmamembrán felépítésében vesznek részt. A gén kifejeződése erős a gümő inváziós és nitrogénkötő zónája között található átmeneti zónában, ahol a baktériumok szaporodása és a sejtek növekedése a jellemző. Azokban a sejtekben fejeződik ki, amelyek infekciós fonalat tartalmaznak. Kifejeződésének beindításához a *Rhizobium* által termelt Nod faktor is elegendő (Horváth és mtsai., 1993).

Az *enod8* korai nodulint *M. sativa*-ból izolálták, mint olyan gént, amely mind az aktívan nitrogénkötő, mind az üres gümőkben kifejeződik. Szekvenciája az *enod2* génhez mutat homológiát (Dickstein és mtsai., 1993; Peng és Dickstein, 1994).

Az *enod10* korai nodulint lucernából izolálták a borsó *enod12* génjével mutatott gyenge hasonlóság alapján (Löbner és Hirsch, 1993). Kifejeződése a borsó *enod12*-től abban tér el, hogy csak az olyan sejtekben fejeződik ki, amelyek infekciós fonalat tartalmaznak.

Az *enod13*-t szójából izolálták. Szekvenciája és kifejeződése alapján homológiát mutat a szója *enod2* génjéhez, ezért feltételezik, hogy az Enod13 fehérje a sejttal építőeleme, és az *enod2*-höz hasonlóan az oxigén sorompó felépítésében játszik szerepet (Franssen és mtsai., 1992).

Az *enod16* és *enod20* géneket *M. truncatula*-ból azonosították (Greene és mtsai., 1998) és megállapították, hogy egy kis géncsalád tagjai, amelyek a fitocianinokhoz hasonlóak. Kifejeződésük a *Rhizobium*-mal való fertőzés után néhány nappal indul be, és a nitrogénkötés kezdetével erősen lecsökken.

Az *enod40* korai nodulin gént több pillangós fajból is izolálták: szójából (Kouchi és Hata, 1993; Yang és mtsai., 1993), babból (Vijn és mtsai., 1995b; Papadopoulou és mtsai., 1996), lucernából (Crespi és mtsai., 1994), és *Sesbania rostrata*-ból (Corich és mtsai., 1998). Jelenlétét bebizonyították a nem-pillangós dohány növényben is (van de Sande és mtsai., 1996). Az *enod40* gén kifejeződése először a gümőprimórdiummal szemben, a gyökér periciklusában mutatható ki (Vijn és mtsai., 1993; Yang és mtsai., 1993). A gén érdekessége, hogy mRNS-e nem tartalmaz hosszabb fehérje kódoló szakaszt; ennek ellenére az első ATG kodonnal kezdődően egy rövid fehérje íródik át, amely az *enod40* szerepének betöltéséhez nélkülözhetetlen (van de Sande és mtsai., 1996). Lucernából két, az *enod40* génnek megfelelő genomi szakaszt izoláltak, és megállapították, hogy az egyik kifejeződése gümőspecifikus, míg a másik szimbiózis hiányában is megnyilvánul a gyökérben, és kifejeződése megfigyelhető nem szimbiotikus növényi szövetekben is (Fang és Hirsch, 1998).

A *M. truncatula* *MtPRP4* korai nodulinja egy feltételezett prolinban gazdag fehérjét kódol, amelynek érdekessége, hogy a fejlődő és kifejlődött gümő osztódó sejtjeiben nyilvánul meg magas szinten (Wilson és mtsai., 1994).

A babból (*Vicia faba*) izolált *VfENOD-GRP3* korai nodulin az első, gümőből jellemzett nodulin, amely a glicinben gazdag proteinekhez mutat homológiát. A glicinben gazdag a fehérjék a sejt fal felépítésében vesznek részt. A *VfENOD-GRP3* kifejeződése a gümő fertőzési és nitrogénkötési zónái közötti átmeneti zónában magas, majd gyorsan lecsökken. A feltételezett kódolt fehérje C-terminálisa 31%-ban tartalmaz glicint (Küster és mtsai., 1995). Újabban további glicinben gazdag proteinek kódoló korai nodulinokat is jellemeztek babból, amelyek szintén a gümő átmeneti, illetve előfixációs zónájában fejeződnek ki (Schröder és mtsai., 1997).

Az *Msca1* egy *Medicago*-ból izolált korai nodulin gén, amely egy karbon-anhidráz enzimet kódol. Szerepe valószínűleg az osztódó sejtek megnövekedett amiloplaszt lerakódásához kötött (Coba de la Pena és mtsai., 1997).

A *Srchi13* korai nodulin gént *Sesbania rostrata*-ból izolálták. A gén homológiát mutat a savas kitinázokkal, ami arra utal, hogy a Nod faktorok hatásását befolyásolja a gümőképződés során (Goormachtig és mtsai., 1998).

2.4.2. Az *enod12* korai nodulin gén.

Az *enod12* gén a legtöbbet tanulmányozott és legalaposabban tanulmányozott és jellemzett korai nodulin gén. cDNSét először *R. leguminosarum* biovar *viciae* baktériummal fertőzött borsó (*Pisum sativum*) gyökérgümőből készített cDNS könyvtárból izolálták és két, egymáshoz nagyon hasonló szekvenciájú gént azonosítottak (Scheres és mtsai., 1990a). Ezután

azonosítottak *enod12* gént *M. sativa* ssp. *sativa*-ban, *M. truncatula*-ban és babban (Allison és mtsai., 1993; Pichon és mtsai., 1992; Vijn és mtsai., 1995b). A *M. sativa* szintén két, egymáshoz hasonló *enod12* gént tartalmaz, a másik két növényfaj pedig egyet-egyet. A különböző pillangós növényekből izolált *enod12* gének nukleotid szekvenciájából adódó fehérje szekvenciák összehasonlítása a 4. ábrán látható. A fehérjék szekvenciája alapján feltételezik, hogy az N-terminális végükön egy szignál peptidet tartalmaznak, amelyet prolinban gazdag pentapeptidek ismétlődése követ. A különböző *Enod12* feltételezett fehérjeszekvenciák közötti legjelentősebb különbség az ismétlődő pentapeptidek számában van. A fehérjék magas prolin tartalma alapján feltételezték, hogy az *Enod12* a hidroxy-prolinban gazdag glikoproteinek családjába tartozik, és valószínűleg a sejtfaik felépítésében játszik szerepet (Scheres és mtsai., 1990a; Govers és mtsai., 1991; Showalter, 1993). A dolgozatban bemutatott munkák megkezdésekor még csak a borsó *enod12* génje volt ismert és részlegesen jellemzett. A különböző *Medicago* fajok *enod12* génjeinek izolálására és jellemzésére ezután, többek között az ebben a dolgozatban bemutatott munkának a keretei között került sor.

A borsóból izolált mindkét *enod12* gén kifejeződése azonos. Mindkettő megnyilvánul a Nod faktorról kezelt hajszálgökökben, az infekciós fonalat tartalmazó gyökérsejtekben, valamint az ezekkel közvetlenül szomszédos, infekciós fonalat nem tartalmazó sejtekben (Govers és mtsai., 1991; Horváth és mtsai., 1993). Ezzel szemben a *M. sativa* két *enod12* génjének kifejeződése eltérő. Az *Msenod12B* kifejeződése néhány órával a Nod faktorról való kezelés után már kimutatható a kezelt gyökerekben, míg az *Msenod12A* csak a már kialakult, fiatal gümőkben nyilvánul meg. Különbözik a két *Msenod12* gén abban is, hogy míg az *Msenod12A* gén csak gümőkben mutatható ki, addig az *Msenod12B* gén megnyilvánul egyéb növényi szövetekben is, bár jóval kisebb mértékben (Bauer és mtsai., 1994). Ennek a kifejeződési mintának a lehetséges magyarázata, hogy az *Msenod12B* gén egy eredetileg nem gümöspecifikus gén átalakulásának közbülső állomása, amikor a gén már erősebben nyilvánul meg a gümőben, de kifejeződése még kimutatható egyéb, nem szimbiotikus növényi szövetekben is. *In situ* hibridizációs kísérlettel kimutatták, hogy az *enod12* gének kifejlett gümőkben az állandó osztódószövet mögötti régióban, az elő-fixációs zóna disztális részén nyilvánulnak meg (Scheres és mtsai., 1990a; Pichon és mtsai., 1992; Vijn és mtsai., 1995b; jelen dolgozat 5.2.1. fejezete).

Borsó genomi könyvtárból izolálták a *Psenod12*-nek megfelelő genomi klónt. A promóter analízise során megállapították, hogy az ATG kodont megelőző 200 bázispárnyi szekvencia elegendő a gén gümöspecifikus megnyilvánulásához (Vijn és mtsai., 1995a). Az is kiderült, hogy a *Psenod12* promóterje nem tartalmazza azokat a konzervált szekvenciákat, amelyek egyes késői nodulinok és az *enod2* promóterében megtalálhatók (Sandal és mtsai., 1987; Lauridsen és mtsai., 1993). Ez az adat azt a feltételezést sugalmazza, hogy a *Psenod12* megnyilvánulásának szabályozása eltér azoktól a szabályozó mechanizmusoktól, amelyek a későbbi gümöspecifikus gének kifejeződését meghatározzák. A *Psenod12* promóter segítségével izoláltak egy olyan

		10	20	30	
1	M A S F L	L S I L V F F L S	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L N P	Msenod12A	
1	- - - -	- - - - - - - -	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L N P	Mcenod12A	
1	M A S F S	L S I L V F F F S	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L Y P	Mtenod12	
1	- - - -	- - - - - - - -	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L N P	Mqenod12	
1	M A S F L	L S T L V F F L A	A L I L V P Q Q G L A Q Y H L N P	Vsenod12	
1	M A S F S	L S I L V F F F I S	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L N P	Msenod12B	
1	- - - -	- - - - - - - -	A L V L V P Q Q G F A E Y Y L N P	Mcenod12B	
1	M A S F F	L S S L V L F L A A L I	L V P Q Q G L A Q Y H L N P	Psenod12A	
1	M A S L F	L S S L V L F L A A L I	L V P Q Q G F A Q Y H L N P	Psenod12B	
		40	50	60	
31	A Y R P P Q T	- - - - - - - -	- - - - - - - -	E P P	Msenod12A
17	A Y R P P Q T	- - - - - - - -	- - - - - - - -	E P P	Mcenod12A
31	A Y R P P Q T K P P V N K P	S H K E P P V N K P P H K E P P	- - - - - - - -	E P P	Mtenod12
17	A Y R P P Q T K P P V N K P	P P H K E P P V H K P P H K E P P	- - - - - - - -	E P P	Mqenod12
31	V Y E A P V N G	P P V N K P P Q K E T P V Q K P P Q K E P P	- - - - - - - -	E P P	Vsenod12
31	A Y R P P Q T K P P V N K P	S H K E P P V H K P P H K E P P	- - - - - - - -	E P P	Msenod12B
17	A Y R P P Q T K P P V N K P	S H K E P P V H K P P H K E P P	- - - - - - - -	E P P	Mcenod12B
31	V Y E P P V N G	P P V N K P P Q K E T P V H K P P Q K E T P	- - - - - - - -	E P P	Psenod12A
31	V D E P P V N E	P T V N K P P Q K E T P V - - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Psenod12B
		70	80	90	
41	V H K P P H K E P P V H K P P H K D P P V N K P P Q K E P P	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Msenod12A
27	V H K P P H K E P P V H K P P H K D P P V N K P P Q K E P P	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mcenod12A
61	V - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mtenod12
47	V - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mqenod12
61	V H K S P R N E P P R H K P P - - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Vsenod12
61	V N K P R H K E P P V H K P P H K D P P V N K P P Q K E S P	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Msenod12B
47	V N K P R H K E P P V H K - - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mcenod12B
61	V H K P P Q K E P P R H K P P H K K S H	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Psenod12A
52	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Psenod12B
		100	110		
71	V H K P P R K E P P T H R H P P S E D N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Msenod12A
57	V H K P P R K E P P T H R H P P X E D N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mcenod12A
81	V H K P P R K E S P T H R H P P A E D N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mtenod12
67	V H K P P R K E P P T H R H P P X E D N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mqenod12
91	L H V T - - - K R S Y G K H A T E E H S I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Vsenod12
91	V H K P P R K E P P T H K H P P A E D N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Msenod12B
59	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Mcenod12B
91	L H V T - - - K P S Y G K H P T E E H N I H F	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Psenod12A
71	L H V - - - - - Y D K H L T A E H N I H I	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - -	Psenod12B

4. ábra. Különböző pillangós növényekből izolált *enod12* génekből származó feltételezett fehérje szekvenciák összehasonlítása. **Ps:** *Pisum sativum*; **Ms:** *Medicago sativa* ssp *sativa*; **Mc:** *M. sativa* ssp *coerulea*; **Mq:** *M. sativa* ssp. *quasifalcata*; **M.t.:** *M. truncatula*; **V.s.:** *Vicia sativa*. Az azonos fajból származó eltérő szekvenciájú *enod12* géneket A és B betűkkel különböztettük meg. A megegyező aminosavak fekete négyzetben láthatók.

DNS-hez kötődő fehérjét, amely valószínűleg szerepet játszik az *enod12* gén szabályozásában (Christiansen és mtsai., 1996).

Bár általánosan elfogadott volt, hogy az *enod12* szükséges a gyökérgümő kialakulásához, ennek alátámasztására semmilyen bizonyíték nem állt rendelkezésre. Ezen dolgozatban az *enod12* gén gümőképző dúsban betöltött szerepének meghatározásához olyan növényeket vizsgáltunk, amelyekből hiányzik az *enod12* gén.

2.4.3. Késői nodulinok.

A késői nodulinok működése a nitrogén megkötése, vegyületekbe való beépítése, valamint a nitrogéntartalmú vegyületek szállítása folyamán jelentős. Ezen túlmenően fontos a részvételük a nitrogén és szén anyagcserében és az oxigén szállításában is. A korai nodulinoktól eltérően a késői nodulinok többségének szerepe jól ismert (Govers és mtsai., 1987; Verna és

Delauney, 1988; Nap és Bisseling, 1990).

A leghemoglobinok a legjelentősebb mennyiségben termelődő és a legalaposabban jellemzett nodulinok. Egy kis gén család kódolja ezeket a kisméretű hemoproteinek, amelyek a bakteroidok oxigén szükségletének kielégítésében játszanak szerepet (Baulcombe és Verma, 1978; Sullivan és mtsai., 1981; Brisson és Verma, 1982). A gümő belsejében minimálisan szükséges oxigén koncentráció fenntartása lényeges a működés szempontjából, mivel a nitrogénáz enzim erősen oxigén-érzékeny. A leghemoglobin hem csoportját a baktérium termeli, míg a globin rész növényi eredetű (Nap és Bisseling, 1990). Lucerna gyökérgümőben a leghemoglobin kifejeződése az infekciós és a nitrogénkötő zóna határán kezdődik, és a nitrogénkötő zónában éri el maximumát (de Billy és mtsai., 1991). Újabban azonosítottak egy olyan gént, amely a leghemoglobin gén családjába tartozik, de kifejeződése a Nod faktorokkal való kezelés után már egy órával beindul, és egyre erősödik, majd a kifejelett gümőben éri el maximumát. Feltételezik, hogy ennek a leghemoglobinnak a szimbiózis kezdetén, a megnövekedett oxigén fogyasztású gyökérszőrök oxigénnel való ellátásában van szerepe (Heidstra és mtsai., 1997). Ennek a korai leghemoglobin génnek az időbeli kifejeződése azt sugallja, hogy a korai és késői nodulinok mellett létezhetnek olyan nodulin gének is, amelyek szimbiózis kezdetétől a végéig működnek, és szerepük a szimbiózis előrehaladtával változik. A korai leghemoglobin azonosításából az is kitűnik, hogy a nodulinok besorolása a korai és késői nodulin kategóriákba dinamikusan változik a szimbiózisban résztvevő gének növekvő számával és egyre alaposabb megismerésével.

Két további késői nodulin gént izoláltak lucernából, amelyek szerepe ismeretlen. A két nodulin, nodulin22 (Dunn és mtsai., 1988; Allen és mtsai., 1992) és nodulin25 (Kiss és mtsai., 1990), kifejeződése hasonló az leghemoglobin gén kifejeződéséhez.

A gümő specifikus cukroz szintáz gént (nodulin-100) szójából izolálták (Thummler és Verma, 1987). Ez a gén nagy mennyiségben íródik át és egy kb. 90 kDa nagyságú fehérjét kódol, amely a szója cukroz szintáz enzimjének alegysége. Az enzim maga tetramer, és a gümő citoszoljában található meg. A gümőfejlődés során a cukroz szintáz aktivitása gyorsan növekszik, majd az elöregedett gümőkben az enzim alegységeire bomlik. Az enzim szerepe a levelekből a gümőkbe szállított cukroz glükózra és fruktózra hasításában, és így a nitrogénkötés energia-ellátásában van.

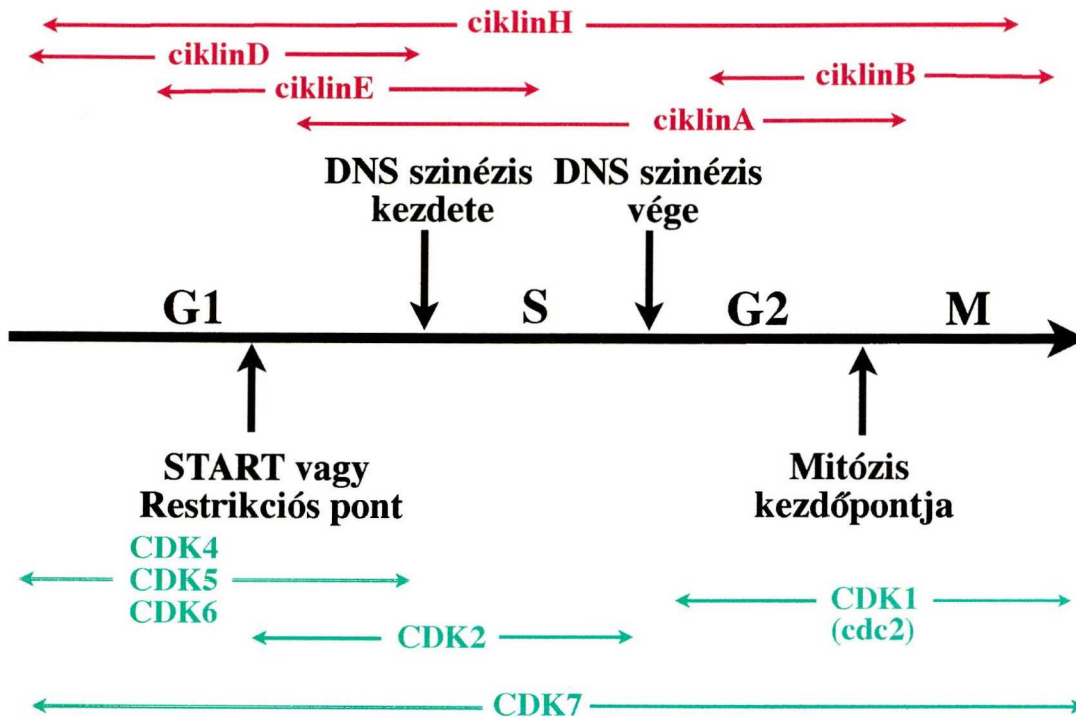
A gümő specifikus glutamin-szintetáz a bakteroidok által termelt ammónia szerves N-tartalmú vegyületekbe való beépítésében játszik szerepet (Robertson és mtsai., 1975). Az enzim a bakteroidokat tartalmazó sejtek citoplazmájában található meg. A gümőspecifikus urikáz (nodulin-35) a gümő citoplazmájában megtalálható, második legnagyobb mennyiségben termelődő fehérje, amely a bakteroidot nem tartalmazó sejtekben fejeződik ki. Szerepe a nitrogén allantoinná alakításában van, amely a szimbiózisban megkötött nitrogén raktározott formája (Bergmann és mtsai., 1983). A N-tartalmú szerves vegyületek szénvázának felépítéséhez szükséges szén előállításában a foszfoenolpiruvát-karboxiláz és a gümőspecifikus karbon-anhidráz játszik szerepet (Munoz és mtsai., 1996).

2.5. A sejtciklus általános jellemzői és a sejtciklus reaktivációja a lucerna gyökérgümő képződése során.

A *Rhizobium* Nod faktorainak jelentős hatása, hogy a pillangós növények gyökér periciklusának sejtjeit osztódásra serkenti, ami által kialakul a gümőprimordium. A növényi szervezet, valamint a pillangós növények *Rhizobium*mal kialakított szimbiózisa egyedi lehetőséget nyújt a sejtosztódási ciklus vizsgálatára. Jellemző a növényekre, hogy merisztémájuk az egyedek egész élete alatt megőrzi osztódó képességét, ami által a növények folyamatosan nőnek, illetve változtatják alakjukat. Másrészt a növény bizonyos, már nyugalomban lévő, differenciálódott sejtjei különböző vegyületek (pl. növényi hormon, Nod faktor) hatására képesek újra belépni a sejtciklusba, és osztódni. Ilyen esemény az oldalgyökerek képződése auxin hatására, illetve pillangós növényeknél a gümőfejlődés Nod faktor hatására. Ezek a kizárólagosan növényekre jellemző tulajdonságok arra engednek következtetni, hogy a növényi sejtciklus szabályozásának lehetnek egyedülálló, csak a növényekre jellemző lépései.

Az eukarióták, és így a növények sejtosztódási ciklusa intenzív tanulmányozás alatt áll. Az eukarióta sejtek osztódási ciklusa pontosan időzített, meghatározott sorrendű események sorozata. A sejt teljes DNS készlete először megkettőződik (S-fázis), majd a sejt kettéosztódik, megkettőződött DNS állományát egyenlően elosztva az utódsejtek között (mitózis vagy M-fázis). Ennek a két fázisnak egymáshoz képest tökéletesen időzítve kell lezajlania a sejtosztódás pontos és sikeres lefolyásához. A két fázist nyugalmi fázisok választják el egymástól, amelynek során a sejt növekszik, és eléri a következő fázisba való belépéshez szükséges állapotot. A mitózist a G1 nyugalmi fázis követi, míg az S-fázis után a sejtek G2 nyugalmi fázisban készülnek fel a következő mitózisba való belépésre (5. ábra). Növények esetében kimutatták, hogy mind a kilépés a sejtosztódási ciklusból a differenciálódás felé, mind a belépés a sejtciklusba a már differenciálódott állapotból, a nyugalmi fázisok alatt történik (lásd Hirt, 1996).

A sejtciklusban ellenőrzési pontok iktatódnak, amelyeken a sejt csak akkor juthat át, ha az ellenőrzési pontot megelőző események sikeresen és teljes mértékben végbementek (Hartwell és Weinert, 1989). Ellenkező esetben a sejtosztódás az ellenőrzési ponton leáll, és a sejt nem fejezi be az osztódási ciklust. Eukarióta sejtekben a sejtciklus sikeres lefolyását két fontos ellenőrzési pont biztosítja. Az egyik a G1 fázisban található START, vagy restrikciós pont (lásd 5. ábra). Az ezen a ponton való áthaladás fő feltételei a sejt mérete, valamint táplálékkal való ellátottsága. Többsejtűeknél a szomszédos sejtekből érkező információk is befolyásolják a sejtciklus továbbhaladását az S-fázis felé. Az ellenőrzési ponton való áthaladás után a sejtek érzéketlenekké válnak ezekre a befolyásoló tényezőkre egészen az új G1 fázisig. A sejtosztódási ciklus másik lényeges ellenőrzési pontja a G2 fázisban lévő "ENTRY" pont, amely a mitózisba való belépést előzi meg. Az ezen a ponton való átjutás feltétele, hogy a megelőző S fázisban a sejt DNS-ének



5. ábra. A sejtciklus különböző fázisai, és a különböző fázisokban résztvevő CDK-k és ciklinek. A fekete nyilak jelölik a DNS szintézis kezdetét és végét, valamint a két fontos ellenőrzési pontot: a START vagy Restrikciós pontot a G1-S fázis átmeneténél és a mitózisba való belépést megelőző kezdő- vagy ENTRY pontot. Kék színnel vannak feltüntetve a sejtciklus különböző fázisaiban résztvevő ciklin-függő-kinázok, pirossal vannak feltüntetve a sejtciklus különböző fázisaiban résztvevő ciklinek. Az adott fehérje neve mellett azonos színű nyilak jelölik, hogy a sejtciklus mely fázisá(i)ban játszik szerepet.

megkettőződése teljesen és tökéletesen végbemenjen.

Növényeknél az oldalgyökér kialakulása a gyökér periciklus sejtjeinek osztódásával kezdődik. A gyökér periciklus egyes sejtjei a G2 fázis állapotában konzerválódtak, és *Arabidopsis* növényekben kimutatták bennük *cdc2* (lásd alább) mRNS-ének jelenlétét (Hemerly és mtsai., 1993; Martinez és mtsai., 1992). A ciklinek közül a *cyc2* fejeződik ki ezekben a sejtekben, míg a *cyc1* mitotikus ciklin jelenlétét nem sikerült bennük kimutatni (Ferreira és mtsai., 1994a). Az *Arabidopsis* sejtciklusa során a *cyc2* gén kifejeződése már a késői S-fázisban megkezdődik, míg a *cyc1* gén kifejeződése csak a késői G2 fázisban indul be (Ferreira és mtsai., 1994b). Így ezen marker gének segítségével sikerült kimutatni, hogy a gyökér periciklusának a sejtciklusba való belépésre hajlamos sejtjei a korai G2-fázisban álltak meg a sejtosztódásban, ami által ezek a sejtek igen érdekesek a mitózisba való belépés aktiválásának tanulmányozásához.

Az oldalgyökér képződéstől eltérő folyamat pillangósok esetében a gyökérgümő képződése, amely a gyökér kéregsejtjeiben indul meg. A Nod faktorok hatására a gyökér már differenciálódott külső és belső kéregsejtjei a G1 fázisban kapcsolódnak be a sejtosztódásba. A két gyökér kéregsejttípus azonban eltérően válaszol a Nod faktor kezelésre. A belső kéreg-

sejtekben a sejtosztódási ciklus teljesen lejátszódik és a sejtek egymást követő osztódásával kialakul a gümőprimordium, majd a gyökérgümő. Ezzel szemben a külső kéregsejtek az S fázison túljutva megmaradnak a G2 állapotban és nem fejezik be a sejtosztódási ciklust (Yang és mtsai., 1994). Ezeknek a sejteknek sejtmagja a sejt közepére vándorol, és bennük elő-infekciós fonál alakul ki (Bakhuizen, 1988; van Brussel és mtsai., 1992). Ez az elő-infekciós fonál alakul később infekciós fonállá, amely segíti a baktériumok bejutását a gümő sejteibe. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a sejtciklus lépései nemcsak a gümő szerkezetének kialakításában játszanak szerepet, hanem az infekciós folyamat lejátszódásához is hozzájárulnak.

A növények sejtosztódási ciklusában a növényi hormonok jelentős szerepet játszanak, bár az még nem ismert, hogy ezek a hormonok milyen módon fejtik ki hatásukat a sejtciklusra. Auxin hatására a gyökér periciklusának a sejtjei lépnek be a sejtciklusba, és kialakul az oldalgyökér primordium. Ezzel szemben a citokininek a Nod faktorok hatását imitálva a belső kéregsejteket aktiválják, létrehozva a gümő primordiumot (Hirsch és Fang, 1994). Az etilénről kimutatták, hogy gátolja a gümőképződést borsón (Guinel és LaRue, 1991). Az utóbbi években történt jelentős előrelépések ellenére a növényi sejtosztódási ciklusról még mindig jóval kevesebbet tudunk, mint az élesztők, illetve az emlősök sejtciklusáról. Több ciklint, és ciklin függő kinázt azonosítottak különböző növényfajokból, de a sejtciklus emlősökben ismert sok egyéb résztvevőjét még nem sikerült kimutatni bennük.

2.5.1. Ciklin függő kinázok.

Az eukarióta sejtciklus adott fázisának sikeres lefolyásához a megfelelő ciklin-függő-kináz aktivitása elengedhetetlen. A ciklin-függő kinázok (CDK, cyclin-dependent-kinase) olyan szerin/treonin kinázok, amelyek központi szerepet játszanak az eukarióták sejtciklusának szabályozásában. A különböző CDK-k 30-36kDa molekulasúlyúak, és egymással legalább 50%-ban homológok (Meyerson és mtsai., 1992). CDK-kat először élesztőből (*Scizosaccharomyces pombe* és *Saccharomyces cerevisiae*) izolálták. Ezekben a fajokban egyetlen ciklin-függő kináz működik a sejtciklus különböző fázisaiban (Nathmys, 1993). Emlősökben több CDK-t is azonosítottak, amelyek a sejtciklus meghatározott szakaszaiban aktiválódnak (lásd Pines, 1995). A CDK-k átíródása a sejtciklus alatt gyakran folyamatos és működésük főleg post-transzkripcionálisan szabályozott. A sejtciklusban való szerepük betöltéséhez elengedhetetlenül szükséges a ciklinekkel való kapcsolódásuk, valamint különböző konzervált aminosavak foszforilálása, illetve defoszforilálása (lásd Morgan, 1995; Pines, 1994; 1995).

Az egyik fontos foszforilálási lépés, amely a ciklin-CDK komplex aktivitásához szükséges, a CDK Thr-160/161 aminosavának foszforilálása (Draetta, 1993). Ezt a p40^{MO15} nevű kináz végzi el (Poon és mtsai., 1993), amely maga is a CDK-k családjába tartozik (CDK7, Pines, 1995), és aktivitásához szükséges a ciklinH nevű fehérjével való kapcsolódása, valamint konzervált aminosavainak foszforilálása, illetve defoszforilálása. A ciklin-CDK komplex aktivitásához szintén szükséges a CDK Thr14 és Tyr15 aminosavainak defoszforilálása (Gould

és Nurse, 1989; Krek és Nigg, 1991). Ezek az aminosavak csak akkor foszforilálódnak, amikor a CDK már kapcsolódott a megfelelő ciklinhez, és a Thr160/161 aminosav is foszforilált állapotban van. Így a ciklin-CDK komplex inaktivált állapotban halmozódik fel, majd a sejtciklus megfelelő fázisában gyorsan aktiválódik a Thr14 és Tyr15 aminosavainak defoszforilálása útján (Norbury és Nurse, 1993). A defoszforilálást a *cdc25* nevű foszfatáz végzi, amelynek aktiválása szintén foszforiláció útján történik (Kumagai és Dunphy, 1991).

Ezen kívül gátló fehérjék is résztvesznek a ciklin-CDK komplex aktivitásának szabályozásában. Ezek a ciklin-CDK komplexhez kapcsolódva gátolják annak működését (Elledge és Harper, 1994).

Magasabbrendű növényekből a *cdc2*-höz hasonló gének izolálására irányuló kísérletek bizonyították, hogy a növények esetében is több ciklin függő kináz játszik közre a sejtciklus lefolyásában. Az élesztő és emlős CDK-khoz hasonló géneket azonosítottak többek között kukoricából (Colasanti és mtsai., 1991), rizsből (Hashimoto és mtsai., 1992), szójaból (Miao és mtsai., 1993), borsóból (Feiler és Jacobs, 1991), *Antirrhium*-ból (Fobert és mtsai., 1994), *Arabidopsis*-ből (Ferreira és mtsai., 1991; Hirayama és mtsai., 1991) és lucernából (Hirt és mtsai., 1991; 1993; Magyar és mtsai., 1997). Ezek a ciklin függő kinázok többségükben a növényi osztódó szövetekben nyilvánulnak meg, de például egyes növényi *cdc2* gének bizonyos nem-osztódó, de osztódásra hajlamos sejtekben is kifejeződnek. Így például gyökér periciklus sejteiben, amelyekről ismert, hogy oldalgyökér képződés esetén újra osztódó képessé válnak (Hemerly és mtsai., 1993; Martinez és mtsai., 1992), vagy lucerna protoplasztokban, amelyekben a sejtosztódási ciklus hormonnal indukálható (Magyar és mtsai., 1993).

2.5.2. Ciklinek.

A ciklinek családja igen változatos. Ezek a fehérjék a ciklin-függő kinázok szabályozó alegységei. Szekvenciájukban megtalálható a ciklin-box nevű szekvencia rész, amely konzerválódott a ciklinek között és a CDK-val való kapcsolódásért felelős (Nugent és mtsai., 1991; Kobayashi és mtsai., 1992; Lee és Harlow, 1993; Zheng és Ruderman, 1993). Többségük termelődése és lebomlása a sejtciklusban ciklikus és fázisspecifikus, de vannak olyan ciklinek is, amelyek mennyisége a sejtciklus folyamán változatlan (Glotzer és mtsai., 1991; Lew és mtsai., 1991; Tyers és mtsai., 1993; Amon és mtsai., 1993; Xiong és mtsai., 1993; Meskine és mtsai., 1995). A ciklikusan kifejeződő ciklinek szerepük betöltése után leválnak a CDK-ról és gyorsan lebomlanak. A ciklineket több csoportba sorolhatjuk, és ezek a csoportok a sejtciklus eltérő fázisaiban játszanak szerepet. Általánosan elfogadott, hogy a G1 fázisban a D- és E-típusú ciklinek játszanak szerepet, de az E-típusú ciklinek működése átnyúlik az S fázisra is. Az S fázisban megkezdődik az A-típusú ciklinek termelése, míg a mitózis fázisára elsősorban a B-típusú ciklinek működése jellemző (Pines, 1995; Hirt, 1996). Vannak azonban kivételek is ez alól a csoportosítás alól. Például egyes élesztőből izolált B-típusú ciklinek a G1 fázisban vesznek részt (Bueno és mtsai., 1991). A ciklinek egy újabb csoportja, a H-típusú ciklinek a CDK7-tel

kapcsolódva más CDK-k 160/161-es aminosavainak foszforilálásában, és ezáltal aktiválásában játszanak szerepet (Fisher és Morgan, 1994; Makela és mtsai., 1994).

A G1 fázisban jelentős szerepet játszó D-típusú ciklinekről emlősökben kimutatták, hogy a három különböző ciklinD létezik, amelyek főleg a CDK4-hez és a CDK6-hoz kapcsolódnak (Matshusime és mtsai., 1994; Meyerson és Harlow, 1994). Ezek a ciklinek rövid életű fehérjék. Mennyiségüket a mRNS-ük átíródásának sebessége határozza meg, amelyet a növekedési faktor befolyásol (Matshusime és mtsai., 1991; Sherr, 1993). Az azonos fajokból izolált különböző D-típusú ciklinek szerepe eltérő a sejtciklus folyamán, és egymást nem helyettesítik (Kato és mtsai., 1993). A D-típusú ciklinek ciklin box szekvencián kívül tartalmaznak egy retinoblasztoma fehérje (Rb)-kötő motívumot is. Ez az LXCXE motívum köti meg az Rb fehérjét, amit aztán a ciklinD-hez kapcsolódó kinázok foszforilálnak (Dowdy és mtsai., 1993; Wiman, 1993). Ez a foszforilálási lépés, amely által a Rb-hez kötött transzkripció faktorok szabaddá válnak, jelentős a G1 fázisból való kilépéshez (Nevins, 1992; Weinberg, 1995). A D-típusú ciklinek tartalmaznak továbbá legalább egy PEST motívumot, amely valószínűleg a fehérje gyors lebomlásáért felelős (Rechsteiner, 1988; Rogers és mtsai., 1986).

Az E-típusú ciklinek a késői G1-fázisban és az S-fázisban játszanak szerepet, kináz partnerük a CDK2 (Dulic és mtsai., 1992). Ez a ciklin-CDK komplex felelős a DNS megkettőződésének elindításáért. Hiányukban a sejtek megmaradnak a G1-fázisban, és a DNS megkettőződése nem kezdődik el (Knoblich és mtsai., 1994; van den Heuvel és Harlow, 1993). A ciklinE is tartalmazza a PEST szekvenciát, amely a fehérje gyors és specifikus lebomlásáért felelős, feltehetően ubiquitin-közvetített módon (Deshaies és mtsai., 1995).

Az A-típusú ciklinek a CDK2-höz és cdc2-höz kapcsolódva az S- és G2 fázisokban jelentősek, kifejeződésük egészen a mitózis kezdetéig tart. CiklinA hiányában a sejtek nem kettőzik meg DNS-üket, illetve DNS megkettőződés után a G2 fázisban maradnak és nem fejezik be a sejtosztódást (Pagano és mtsai., 1992). Ebből következik, hogy ez a kináz komplex szerepet játszik a DNS megkettőződése során, valamint a sejtek mitózissra való felkészítésében is részt vesz.

A mitózisban elsődleges szerepet játszik a B-típusú ciklinek cdc2-vel alkotott komplexe, amely az összes eukarióta sejtciklusában a legjobban konzerválódott (Nurse, 1990). Ez a kináz kettős szerepű: egyrészt beindítja a mitózist, másrészt részt vesz a mitózisban szerepet játszó egyéb fehérjék foszforilálásában (Nigg, 1993). Amilyen fontos szerepe a mitózis során, ugyanolyan fontos a komplex inaktiválása a mitózis befejeztével. Enélkül a sejtek nem képesek belépni a következő G1 nyugalmi fázisba. A kináz inaktiválása a ciklin rész gyors és specifikus lebomlás útján történik (Hunt és mtsai., 1992). Az A- és B-típusú ciklinek tartalmaznak egy destrukciós box nevű részt a fehérje N-terminális végén, amely a ciklinek lebomlása során nélkülözhetetlen. Mindkét ciklin lebomlása ubiquitin-közvetített úton történik (Glutzer és mtsai., 1991).

Növényekből eddig 61 ciklint azonosítottak. Az emlős szervezetekben talált ciklinekhez való hasonlóságuk alapján ezeket az A-, B- illetve D-típusú ciklinek csoportjába osztották. A csoportokon belül alcsoportokat alakítottak ki, így az A- és D-típusú ciklinek három alcsoportot foglalnak magukba, míg a B-típusú ciklineket két alcsoportra osztották (Renaudin és mtsai., 1996).

A növényi D-típusú ciklineket mutáns élesztők genetikai komplementálásával sikerült izolálni. Megtalálható bennük az Rb-kötő motívum, ami azt feltételezi, hogy a G1/S fázisok közötti átmenet a növények esetében is egy Rb-től függő mechanizmus. A PEST-motívum megléte az összes eddig azonosított növényi D-típusú ciklinben feltételezi, hogy a növényi D-típusú ciklinek lebomlása hasonló az állatokéhoz. Az állati rendszerekhez hasonlóan a növényi D-típusú ciklinek szintézise is indukálható növényi növekedési hormonokkal, és a hormon elvonása után a ciklinek gyorsan lebomlanak (Dahl és mtsai., 1995; Soni és mtsai., 1995).

A legtöbb növényi ciklin az állati A- és B-típusú ciklinekhez hasonló, és szekvencia homológia alapján izolálták őket. A növényi A- valamint B1-típusú ciklinek szekvenciájukban tartalmaznak egy szakaszt amely feltehetően egy nukleáris lokalizációs jel kódolásáért felelős. Ez feltételezi, hogy ezek a ciklinek a sejtciklus egy bizonyos szakaszában a sejtmagban találhatók (Renaudin és mtsai., 1997). E- és H-típusú ciklineket még nem azonosítottak egyetlen növényfajból sem.

Medicago-ból több B-típusú ciklint, valamint az A- és D-típusú ciklinek családjának egy-egy tagját (*cycMs3* és *cycMs4*) azonosították (Hirt és mtsai., 1992; Dahl és mtsai., 1995; Meskiene és mtsai., 1995; Saviouré és mtsai., 1995). A *cycMs3* érdekessége, hogy szekvenciája alapján az emlős A2 típusú ciklinekkel mutat homológiát, kifejeződése azonban a G1 fázisban kezdődik és ezután folyamatosan magas szinten marad. Differenciálódott sejtekben nem mutatható ki, viszont kifejeződése a mitogén növényi hormonnal való kezelés után hamarosan megkezdődik. Az adatok alapján feltételezhető, hogy a *cycMs3* a sejtek nyugalmi állapotából az osztódóképes állapotba való átmeneténél játszik szerepet (Meskiene és mtsai., 1995).

2.6. A lucerna *msc27* nevű génje.

Néhány évvel ezelőtt Györgyey és mtsai (1996) 2,4-D hormonnal kezelt és kezeletlen lucerna sejtkultúrából készített cDNS könyvtárak differenciál hibridizációja során izoláltak egy olyan lucerna gént is, amely egyenletesen erős expressziót mutatott a hormon hatástól függetlenül. Ez a gén hasznos lehet az olyan vizsgálatokban, amelyek során a 2,4-D hormon kezelések hatását vizsgálják különböző lucerna gének kifejeződésére. Mivel az *msc27* kifejeződését ez a kezelés nem befolyásolja, így az *msc27* gén kifejeződésében kimutatható változások mutatják a felhasznált RNS mennyiségéből, illetve minőségéből eredő kísérleti hiba mértékét. A nagyrészt ismeretlen gén szerepének felderítése, valamint annak meghatározása, hogy milyen körülmények között állandó a kifejeződése, még nyitott kérdések. Munkám során az *msc27* jellemzésében vet-

tem részt szekveneciaelemzés, valamint Southern, Northern és *in situ* hibridizációs technika segítségével.

2.7. Az *in situ* hibridizációs technika jelentősége.

A különböző biológiai tudományterületeken sokszor izolálnak géneket, amelyeknek szerepéről semmilyen információ nem áll rendelkezésre. Ezen nukleinsav szekvenciák jelenlétének kimutatása sejtekben, szövetekben, illetve szervekben vagy egész szervezetekben *in situ* hibridizációval, nagy jelentőséggel bír. Az *in situ* hibridizációs technika alkalmazása adatokat szolgáltat a gén térbeli és időbeli kifejeződéséről, amely fontos lépés lehet a gén szerepének megismerése felé. A technika másik fontos alkalmazási területe olyan gének kifejeződésének kimutatása, amelyek csak néhány, specifikus sejtben nyilvánulnak meg. Az ilyen gének kifejeződése a specifikus sejtekben magas, de az egész szövetben, illetve szervben vizsgálva alacsony. Mivel általában lehetetlen csak a specifikus sejtek RNS-ének izolálása egy szövetből vagy szervből, az ilyen gének megnyilvánulásának nyomonkövetésére az esetek többségében a Northern hibridizációs technika nem alkalmas, mert a gén kifejeződésének kimutathatósága a Northern hibridizációs technika érzékenysége alatt marad. Az ilyen gének kifejeződésének kimutatására az *in situ* hibridizációs technika a megfelelő, mivel ez a technika a gén megnyilvánulásának helyén mutatja ki a mRNS jelenlétét.

Az *in situ* hibridizációs technika alapja, hogy egy jelölt nukleinsav (próba) specifikusan kötődik a megfelelő kiegészítő nukleinsav szekvenciához a fixált sejtben, illetve szövetben. Ezután a jelölt nukleinsavat láthatóvá téve, láthatóvá válik az adott nukleinsav térbeli kifejeződésének mintázata a fixált sejtben illetve szövetben. A technikát alkalmazzák DNS szekvenciák kromoszómán való elhelyezkedésének meghatározására, és RNS illetve vírus nukleinsav jelenlétének kimutatására.

Az *in situ* hibridizációs technika sikeres alkalmazásához nagyon fontos a kísérlet körülményeinek pontos beállítása. A fixálás körülményeit úgy kell meghatározni, hogy a nukleinsavak eredeti állapotukban maradjanak meg a kísérlet folyamán a fixált sejtben, illetve szövetben. A fixált és beágyazott anyagban nukleinsavak szintén beágyazottan találhatóak és fontos a metszetek előkezelésének pontos beállítása, ami lehetővé teszi, hogy az anyagban található nukleinsavak a próba számára hozzáférhetővé váljanak. Az alkalmazott kísérleti körülmények eltérőek, attól függően, hogy a próba RNS vagy DNS, illetve, hogy a beágyazott anyag sejtuszupenzió, növényi vagy állati eredetű szövet. Ezen belül is a különböző fajokból származó szövetek, illetve azonos fajból származó különböző eredetű szövetek kezelése eltérő. A kísérleti körülmények beállítása alapos és pontos munkát igényel.

3. Célkitűzések

A szimbiotikus nitrogénkötő gümő kifejlődése a pillangós gazdanövényben és a nitrogénkötésre képes baktériumban végbemenő változások meghatározott sorrendben való bekövetkezésének az eredménye, amelyet a partnerek közötti jelmolekulák cseréje szabályoz. A növény flavonoid-típusú jelmolekulái beindítják a baktériumokban a *nod* gének működését, amely a bakteriális jelmolekulák, a Nod faktorok termelésében és kiválasztásában vesznek részt. A Nod faktorok kulcsfontosságúak a gazdanövény gümőfejlődési programjának beindításában: (i) morfológiai változásokat idéznek elő a gyökérszőrökben, ami elősegíti a baktériumok behatolását a növényi szövetbe, (ii) a gyökér kéregsejtjeiben újra aktiválják a sejtosztódási ciklust, ami a gümő-primordium, és indeterminált gümők esetében az állandó merisztéma kialakulásához vezet. (iii) beindítják bizonyos korai nodulin gének működését, amelyek valószínűleg az új sejtfalak és az infekciós fonál kialakulásában játszanak szerepet. Doktori munkám során elsősorban egy, a Nod faktorok által indukált korai nodulin gén, az *enod12* szerepének megismerését, valamint a sejtciklus szabályozásában résztvevő ciklin gének jellemzését tűztem ki célul. Ezeken túlmenően, harmadik feladatként a lucerna újonnan izolált és nagyrészt ismeretlen *msc27* génjét jellemeztem. Az ismertetett munka fő célkitűzései a következők voltak:

1. Az *enod12* korai nodulin gén jellemzése.

- az *in situ* hibridizációs technika kísérleti körülményeinek beállítása, majd a technika alkalmazása az *enod12* korai nodulin gén térbeli kifejeződésének meghatározására *Medicago* gyökérgümőben.
- az *enod12* gén kópiaszámának megállapítása és öröklődésének nyomonkövetése a diploid *M. sativa* ssp *coerula* és *M. sativa* ssp *quasifalcata* növények keresztezése során.
- az *enod12* hatásának vizsgálata a gümő képződésre és nitrogénkötésre *enod12* genotípusú növények segítségével.

2. *Medicago* ciklinek jellemzése

- a *Medicago* sejtosztódási ciklusában szerepet játszó ciklinek közül a *CyclIIMs* teljes hosszúságú ciklin és a *CycSMs* részleges ciklin szekvenciák összehasonlítása és kimutatásuk a különböző *Medicago* fajok genomjában.
- a *Medicago* *CyclIIMs* és *CycSMs* ciklinek sejtciklus függő kifejeződésének vizsgálata részlegesen szinkronizált lucerna sejt kultúrában.
- a *CyclIIMs* gén kifejeződésének vizsgálata lucerna különböző szerveiben.

3. Az *msc27* gén jellemzése

a lucerna *msc27* géntermék konzerválódásának vizsgálata az adatbázisokban tárolt aminosavszekvenciák segítségével.

- az *msc27* gén jelenlétének kimutatása különböző növények genomjában Southern hibridizációval, és az *msc27* gén kifejező désének vizsgálata eltérően kezelt lucerna sejt kultúrákban és lucerna különböző szerveiben.

- az *msc27* gén térbeli kifejező désének vizsgálata *in situ* hibridizációval lucerna gyökérgümőben.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok.

1XPBS: 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 1.7mM KH₂PO₄.

10XPBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄, 2.4g KH₂PO₄, 1 liter desztillált vízben feloldva. A pH-t HCl-dal állítjuk be 7,4-re. Ennek az alapoldatnak a hígításával állítjuk elő az 1XPBS oldatot.

1XTAE: 0.04M Trisz-acetát, 0.001M EDTA.

50XTAE: 242g Trisz, 57.1ml ecetsav, 100ml 0.5M EDTA, 1 literre feltöltve desztillált vízzel (pH:8,0). Ennek az alapoldatnak a hígításával állítjuk elő az 1XTAE oldatot.

1XTBE: 0.045M Trisz-borát, 0.001M EDTA.

5XTBE: 54g Trisz, 27.5g bórsav, 20ml 0.5M EDTA 1 literre feltöltve desztillált vízzel (pH:8,0). Ennek az alapoldatnak a hígításával állítjuk elő az 1XTBE oldatot.

3M kálium-acetát: 60ml 5M kálium acetát, 28.5ml ecetsav, 100ml-re feltöltve desztillált vízzel. Az így készített oldat 3M-os a káliumra nézve, és 5M-os az acetátra nézve.

20XSSC: 175g NaCl, 88.2g nátrium-citrát, 1 liter desztillált vízben feloldva. A pH-t 10M-os NaOH-dal állítjuk be 7,0-ra.

Fixáló oldat növényi anyagok fixálásához: Négy százalék paraformaldehidet vízben feloldottunk melegítés közben. Az oldódást elősegíti NaOH hozzáadása 3mM végkoncentrációban. Az így nyert oldatot átszűrtük, azonos mennyiségű 0.2M nátrium-foszfát puffert (pH:7,0) adtunk hozzá és jégen hűtöttük. Lehűlés után kiegészítettük a glutáraldehiddel, 0.5% (v/v) végkoncentrációban. A kész fixáló oldatot a felhasználásig jégen tároltuk.

In situ hibridizációs puffer: 50% formamid, 20mM Tris-HCl, pH7.5, 300mM NaCl, 2mM EDTA, 10% dextrán-szulfát, 10mM DTT, 1XDenhardt, 0.05% tRNA

LB: 10g bacto-tripton, 5g bacto-élesztőkivonat, 10g NaCl, 1 liter desztillált vízben feloldva. A pH-t NaOH-val állítjuk be 7.0-ra.

Moviol oldat: 10% poli-vinil-etanol, 25% glicerol, 0.1M Trisz-HCl pH:8.5 desztillált vízben feloldva, 10 percig 50°C-on inkubálni, közben óvatosan kevergetni. Ezután 15 percig centrifugálni 5000xg-vel, majd a felülúszóhoz nátrium-azidot adni 0.08% végkoncentrációban.

Az oldatot 4°C-on tároljuk.

TE: 10mM Trisz-HCl, pH: 7,5; 1mM EDTA, pH:8,0

4.2. Módszerek.

4.2.1. Tárgylemezek poli-L-lizinnel való kezelése.

A metszetek készítéséhez a tárgylemezeket detergenst tartalmazó oldatban alaposan megtisztítottuk, majd folyó desztillált vízben öblítettük őket 1 órán keresztül. 200°C-on szárítottuk őket két órán át. Ezután a tárgylemezeket 100µg/ml poli-L-lizint tartalmazó 10mM-os Trisz-HCl, pH:8,0 oldatba merítettük 10 percig, levegőn szárítottuk és szobahőmérsékleten, pormentes környezetben tároltuk őket a felhasználásig.

4.2.2. Plazmid DNS izolálása baktériumból és a DNS linearizálása az *in situ* hibridizációs próba előállításához.

A baktériumból való DNS kinyerésére a megfelelő plazmidot tartalmazó *Escherichia coli* törzset 500 ml 100µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatban növesztettük egy éjszakán át, állandó rázatás mellett. A sejteket ezután 4000xg-vel centrifugáltuk, 4°C -on, 10 percig. A baktériumpelletet 20ml TEG oldatban (25mM Trisz-HCl pH:8.0, 10mM EDTA, 50mM glükóz) szuszpendáltuk fel, majd az elegyhez 40ml 0.2M NaOH, 0.1% SDS oldatot adtunk, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 10 percig. Ezután 30ml 3M K-acetátot (pH:4.8) adtunk hozzá, és további 10 percig jégen tartottuk. Az elegyet 20 000xg-vel centrifugáltuk 60 percig, 4°C -on. A felülúszóhoz 0.6 térfogat izopropanolt adtunk, majd újra centrifugáltuk 15 000xg-vel, 4°C -on, 30 percig. A DNS pelletet 70%-os ethanolal öblítettük, majd vákuum alatt szárítottuk. A pelletet 27ml TE oldatban oldottuk fel és 31g CsCl-ot, valamint 1.9ml ethidium-bromidot (10mg/ml) adtunk hozzá. Az elegyet 350 000xg-vel centrifugáltuk, vákuum alatt, 4°C -on, egy éjszakán át. Ennek következtében egy CsCl grádiens alakult ki, amiben a DNS egy meghatározott töménységnél összegyűjtődött. A DNS gyűrűt UV fénnel tettük láthatóvá, fecskendő segítségével összegyűjtöttük, és újra centrifugáltuk 5 órát 500 000xg-vel, az előzővel azonos körülmények mellett. Az így nyert DNS/CsCl/ethidium bromid elegyből az ethidium-bromidot azonos térfogatú, vízzel telített buthanol-2-vel való többszöri rázatással távolítottuk el. Ezután az elegyet 1 napig dializáltuk TE oldatban, az oldatot többször cserélve, aminek eredményeként a CsCl-ot sikerült eltávolítanunk. A DNS-t 1/10 térfogat 3M Na-acetát és két térfogat ethanol hozzáadásával csap-tuk ki az

oldatból, -20°C -on, egy éjszakán át. A DNS összegyűjtéséhez az elegyet $10\,000\times g$ -vel centrifugáltuk, 4°C -on, 10 percig. A DNS pelletet 70%-os etanollal mostuk, szárítottuk és steril vízben oldottuk fel $1\mu\text{g/ml}$ töménységűre.

A DNS ellenőrzésére $1\mu\text{g}$ DNS-t emésztettünk a megfelelő restrikciós enzimmel ($1-2\text{U}/20\mu\text{l}$), a gyártó által összeállított pufferben, 37°C -on, 1 órán keresztül. Az emésztési termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk el, amelyet 1XTBE oldatban oldottunk fel és $0.2\mu\text{g/ml}$ ethidium-bromiddal egészítettünk ki. Az emésztési termékeket UV fénnel tettük láthatóvá.

Az *in situ* hibridizációs próba előállításához $10\mu\text{g}$ plazmid DNS-t a megfelelő emésztő-enzimmel linearizáltuk, amely a plazmidot csak egyetlen helyen hasította, közel a próbaként jelöléséhez használni kívánt DNS szakasz végéhez. Az emésztést 20U emésztőenzim felhasználásával végeztük, $100\mu\text{l}$ végtérfogatban, 37°C -on, 1 órán át. Ezután az elegyhez ProteinázK-t adtunk $200\mu\text{g/ml}$ végtöménységben, majd tovább inkubáltuk 37°C -on, 30 percig. Ezután az elegyet azonos térfogat fenol-kloroform hozzáadásával tisztítottuk, majd a felülúszóból a DNS-t $1/10$ térfogat 3M Na-acetát és két térfogat etanol hozzáadásával csaptuk ki, -20°C -on, egy éjszakán át. A DNS pelletet steril, DEPC-vel kezelt vízben oldottuk fel $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ töménységűre, és $1\mu\text{l}$ -t használtunk az *in vitro* transzkripció reakcióban.

4.2.3. *In situ* hibridizációs próba tisztítása.

Az ^{35}S -tel jelölt ribonukleotid jelenlétében végzett *in vitro* transzkripció után az *in situ* hibridizációs próbát Sephadex G75 oszlopon választottuk el a be nem épült nukleotidoktól. A G75 oszlopot a próba tisztítása előtt 100mM DTT-t tartalmazó TE oldattal többször átmostuk. Ezután az *in vitro* transzkripció elegyet az oszlop tetejére rétegeztük és hagytuk a gravitációval behatolni az oszlopba. Ezt követően az oszlopra 100mM DTT-t tartalmazó TE oldatot rétegeztünk $100\mu\text{l}$ -ként, és az oszlop alján külön Eppendorf-csövekbe gyűjtöttük a frakciókat. Minden egyes $100\mu\text{l}$ -es frakcióból $1\mu\text{l}$ -t mértünk a radioaktivitás erősségének mérésére alkalmas berendezés segítségével. A jelölt próba a nagy mérete miatt hamarabb kimosódik az oszlopból, mint a be nem épült nukleotidok, és így a korábbi frakciókban található meg. A próbát tartalmazó frakciókból az RNS-t $1/10$ térfogat 3M Na-acetát és két térfogat etanol hozzáadásával csaptuk ki. A próbát tartalmazó pelletet 100mM DTT-t tartalmazó TE oldatban oldottuk fel megfelelő töménységűre.

4.2.4. Növényi összes DNS izolálása és Southern membrán készítése.

Egy gramm frissen gyűjtött növényi részt folyékony nitrogénben hűtött mozsárban porrá zúztunk, majd 15ml extrakciós puffer mértünk rá (100mM Trisz-HCl, $\text{pH}:8.0$, 50mM EDTA, 500mM

NaCl, 10mM β -mercapto-ethanol). Óvatosan összekevertük és 65°C-on gyorsan felmelegítettük az elegyet. Hozzáadtunk 150 μ g proteináz-K-t és 1/10 térfogat 10%-os SDS-t, és 65°C-on inkubáltuk 20 percig. Ezután az elegyet jégen lehűtöttük és 1/5 térfogat 3M K-acetátot adtunk hozzá. 20 percig 0°C -on inkubáltuk, majd 5000xg-vel centrifugáltuk 30 percig. A felülúszóhoz 0.5 térfogat izopropanolt adtunk, és -20°C -on inkubáltuk egy éjszakán át. A DNS-t 7500xg-vel 20 percig való centrifugálással gyűjtöttük össze. A pelletet 50mM Trisz-HCl, pH:8.0 és 10mM EDTA-t tartalmazó pufferben oldottuk fel és 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH:4.8) és 0.5 térfogat izopropanol hozzáadásával csaptuk ki belőle a DNS-t. Ezt a lépést kétszer ismételtük. Ezután a pelletet TE oldatban oldottuk fel, majd a DNS-t 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH:4.8) és 2.5 térfogat ethanol hozzáadásával csaptuk ki az oldatból. 10 percig centrifugáltuk 10 000xg-vel és a pelletet 70%-os ethanolban mostuk, szárítottuk, majd a DNS-t steril vízben oldottuk fel 1 μ g/ μ l töménységre.

10 μ g növényi teljes DNS-t a megfelelő restriktációs enzimmal (~40U) emésztettünk 400 μ l végtérfogatban, 2 órán át 37°C -on. Ezután még 20U enzimet adtunk hozzá, és tovább emésztettük újabb 2 órán át, 37°C -on. A reakcióelegyhez azonos térfogat fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) keverékét adtuk, és alapos keverés után 5 percig centrifugáltuk 10000 xg-vel. A felső fázisból a DNS-t 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH:4.8) és 2.5 térfogat ethanol hozzáadásával csaptuk ki az oldatból. A pelletet 70%-os ethanolban mostuk, szárítottuk, majd a DNS-t 20 μ l steril vízben oldottuk fel. Az emésztési termékeket 0.8%-os agaróz gélen választottuk el egymástól. Az agarózt 1XTAE pufferben oldottuk fel és ethidium-bromidot adtunk hozzá 0.2 μ g/ml végkoncentrációban. A gél alacsony feszültségen futtattuk egy éjszakán át. Ezután a gél 0.25N HCl oldatban kezeltük 15 percig, állandó gyenge rázatás mellett, majd a gél denaturáló pufferben (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) ráztuk 30 percig, végül neutralizáló pufferben (0.5M Trisz-HCl, pH:7.5, 1.5M NaCl, 1mM EDTA) kezeltük 15 percig. A gélből a DNS-t kapilláris úton juttattuk a membrán felületére 20XSSC-t használva. A DNS-t UV fény segítségével kötöttük meg a membrán felületén, és a membrán a hibridizációig 4°C -on tároltuk.

4.2.5. Növényi összes RNS kinyerése és Northern membrán készítése.

1g frissen gyűjtött növényi anyagot folyékony nirtogénben fagyasztottuk, majd szintén folyékony nitrogénben hűtött mozsárban porrá zúztuk őket. A növényi porhoz 7ml guanidium-thiocianátot tartalmazó puffert adtunk (4M guanidium-thiocianát, 25mM nátrium-citrát, pH:7.0, 0.5% szarkozil, 0.1M β -mercaptoethanol) és jól összekevertük. Az elegyet 12 500xg-vel centrifugáltuk, 4°C -on, 10 percig, kilengő rotorban. Ezzel a lépéssel eltávolítottuk a sejtörmeléket. Centrifugacsőbe 3ml 5.7M CsCl-ot pipettáztunk, és ennek a tetejére rétegeztük az előző centrifugálási lépés után kapott felülúszót. A csöveket kilengő rotorban centrifugáltuk vákuum alatt, 170 000xg-vel, 4°C -on, egy éjszakán át. A centrifugálás következtében az RNS pellet alakban

vált ki a centrifugacső alján. A felülúszót óvatosan leöntöttük, és az RNS pelletet 100µl steril, DEPC-vel kezelt vízben oldottuk fel. Azonos térfogat fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1) elegyével tisztítottuk, majd az RNS-t 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH:4.8) és 2.5 térfogat ethanol hozzáadásával csaptuk ki az oldatból. 10 000xg-vel centrifugáltuk az elegyet 10 percig, 4°C-on. A pelletet 70%-os ethanolban mostuk, szárítottuk, és az RNS-t DEPC-vel kezelt steril vízben oldottuk fel 1µg/µl töménységűre.

A Northern hibridizációhoz a különböző méretű RNS darabokat 1.2%-os agaróz gélen választottuk el. Az agarózt MOPS pufferben oldottuk fel (20mM MOPS, 5mM Na-acetát, 1mM EDTA, 2.2M formaldehid). 15µg RNS-t 2µl térfogatra töményítettünk, majd 12µl denaturáló puffer (50% formamid, 20mM MOPS, 5mM nátrium-acetát, 1mM EDTA, 2.2M formaldehid) és 2µl brómfenolkék oldatot (50% glicerín, 0.25M nátrium-foszfát, pH:6.8, 0.005% brómfenolkék,) adtunk hozzá. A gélt 35mV-on futtatuk egy éjszakán át. A gélből az RNS-t kapilláris úton juttattuk a membránra, az előző fejezetben leírt módon.

4.2.6. A hibridizációs próba jelölése és a hibridizáció.

A hibridizációs próba előállításához ~100ng DNS-t jelöltünk 50µCi ³²P-vel jelölt dCTP jelenlétében "Random primer" módszerrel (Boehringer Mannheim), ahogy az a kezelési utasításokban megtalálható. A jelölt próbát Sephadex G50 oszlopon választottuk el a be nem épült dNTP-től. A jelölés sikerességét szcintillométerben mértük, 1µl jelölt próba felhasználásával.

A Southern, illetve Northern membránokat hibridizációs pufferben (0.5M Na-foszfát, pH:7.2, 7% SDS, 1mM EDTA, 1% BSA) elő-hibridizáltuk általában 65°C -on, 2-3 órán keresztül. Ezután a hibridizációs puffert frissre cseréltük, és hozzáadtuk a jelölt próbát. A membránokat a próbával azonos hőmérsékleten inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Ezt követően a membránokat több lépésben mostuk, hogy eltávolítsuk a nem-specifikusan kötődő próbát. Először 2XSSC, 0.1% SDS oldatában kétszer 20 percig 65°C -on, majd 1XSSC, 0.1% SDS oldatban 20 percig 65°C -on, amit egy esetleges újabb mosás követett 0.5XSSC, 0.1% SDS oldatban 65°C -on, 20 percig. Ezután a membránokra filmet helyeztünk, amit különböző időpontokban hívtunk elő az optimális hibridizációs jel eléréséhez.

4.2.7. Specifikus DNS szakaszok amplifikálása PCR reakcióban és a reverz-transzkripció.

A PCR amplifikáláshoz 100ng növényi összes DNS-t használtunk a reakció elegybe (50mM KCl, 10mM Trisz-HCl, pH:8.3, 0.01% zselatin), amelyet MgCl₂-dal egészítettünk ki 1.5mM végkoncentrációban. Ehhez adtuk hozzá a különböző dNTP-eket (200-200µM végkoncentrációban) és az amplifikációs olidonukleotidokat (1µM végkoncentrációban). Végül az elegyhez 2U *Taq* polimerázt adtunk, és azonos térfogatú ásványi olajjal fedtük be. Ezután a

reakcióelegyet 94°C -on inkubáltuk, 1 percig (kettős szálú DNS szétválasztása), 55°C -ra hűtöttük és ezen tartottuk 1 percig (amplifikációs oligonukleotidok megtapadása az egyszálú DNS-en), majd 72°C -ra melegítettük és 1 percig inkubáltuk (új DNS szál felépítése). Ezt a melegítési-hűtési ciklust 30-szor ismételtük. Az amplifikáció után a termékeket 1.5%-os agaróz gélen választottuk el egymástól. Az agaróz gélt a 4.2.4. fejezetben leírtak alapján készítettük el.

Az *enod12* amplifikálásához használt oligonukleotidok szekvenciája:

enod12-5': 5'-CTGCTCTTGTCTTGTTCCTCAAGG-3'

enod12-3': 5'-GAAATGGATGTTATCTTCTGATGG-3'

Az *msc27* amplifikálásához használt oligonukleotidok szekvenciája:

msc27-5': 5'-GGAGGTTGAGGGAAAGTGG-3'

msc27-3': 5'-CACCAACAAAGAATTGAAGG-3'

A reverz transzkripció kísérletekhez először 10µg teljes növényi RNS-t DNázl-gyel kezeltünk (40mM Trisz-HCl, pH:7.5, 6mM MgCl₂, ~15U RNáz inhibitor, 10U DNázl, 30µl végtérfogatban), 37°C -on, 30 percig. Ezután a reakcióelegyet 75°C -on inkubáltuk 10 percig, majd az RNS-t 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH:4.8) és 2.5 térfogat ethanol hozzáadásával kicsaptuk. 10 percig centrifugáltuk 10 000xg-vel, majd a pelletet 70%-os ethanolban mostuk, szárítottuk, és steril, DEPC-vel kezelt vízben oldottuk fel 1µg/µl töménységűre. 2µg DNázal kezelte RNS-t mértünk a reakcióelegybe (50mM Trisz-HCl, pH:8.3, 8mM MgCl₂, 10mM DTT), amelyet aztán kiegészítettünk a poli-T oligonukleotiddal, (12-18-mer, 1.5µM végkoncentrációban), a dNTP-vel (0.5-0.5µM végkoncentrációban), RNáz inhibitorral (1U/µl végkoncentrációban), végül a reverz transzkriptáz enzimmel (M-MuLV, 200U). Az elegyet 37°C -on inkubáltuk 1 órán át, majd a reverz transzkriptáz enzimet 75°C -on inaktiváltuk, 10 percig. A reakcióelegy 1/10 részét használtuk fel PCR amplifikációs kísérletben, a fentebb leírt módon.

4.2.8. Növények nevelése és a gümözési kísérlet.

A különböző *Medicago* növényekről két-három internóduszt tartalmazó hajtásokat vágunk, ezeket steri I vermikulitba szúrtuk, majd tápoldattal öntöztük meg őket (1.4mM KNO₃, 0.5mM KH₂PO₄, 0.5mM MgSO₄·7H₂O, 0.5mM[NH₄]₂SO₄, 2.32mM Ca[NO₃]₂·4H₂O, 0.037mM KCl, 0.05mM H₃BO₃, 0.05mM EDTA, 8µM MnSO₄·4H₂O, 0.5µM ZnSO₄·7H₂O, 0.25µM CuSO₄·5H₂O, pH: 5,7). A hajtásokat üvegházban tartottuk kb. 2 hétig, amíg 3-4 cm-es gyökeret eresztettek. Ezután a növényeket aeropóniás körülmények mellett, azonos tápoldatban növesztettük tovább 5 napig, majd a tápoldatban lecsökkentettük a nitrogén mennyiséget (0.25mM KNO₃), és így növesztettük őket újabb két napig. Ezután a gyökereket *Rhizobium meliloti* 41-gyel fertőztük, és a fertőzés után 7, 14, 21 és 30 nappal gümöket gyűjtöttünk a növényekről.

A növények fertőzéséhez a *Rhizobium*-ot GTS tápoldatban (Kiss és mtsai., 1979) növesztettük OD₆₀₀=0.3 koncentrációig, és ezt a baktérium oldatot a növényi tápoldathoz adva fertőztük a *Medicago* növények gyökereit.

4.2.9. Acetilén redukáló képesség vizsgálata.

A nitrogénkötés hatékonyságának kimutatása acetilén-redukáló képességgel azon alapul, hogy a nitrogénkötésben résztvevő enzimek képesek az acetilén etilénné történő redukcióját is katalizálni. A méréshez a különböző genotípusú *Medicago* növényeken képződött gümőket szorosán záródó kémcsőbe gyűjtöttük (kb. 10-20mg gümő/cső). Minden csőbe 2ml acetilént mér-tünk, és 1 órán keresztül inkubáltuk őket szobahőn. Ezután minden csőből azonos mennyiségű gázelegyet vettünk ki (kb. 0.25ml), és gázkromatográfbba fecskendeztük őket. A különböző növényekről származó gümők esetében összehasonlítottuk a képződött etilén mennyiséget.

4.2.10. Lucerna sejtszuszpenzió hormon kezelése.

A lucerna (*Medicago sativa* ssp. *sativa* RA3) sejtszuszpenziót 15μM naftil-ecetsavat és 10μM kinetint (alaphormonok) tartalmazó SH-tápoldatban tartottuk fenn (Schenk és Hildebrandt, 1972). A 2,4-D kezeléshez a naftil-ecetsavat 100μM 2,4-D-vel helyettesítettük, és ebben a módosított tápoldatban növesztettük a sejteket 1 órán keresztül. Ezután a szuszpenziót hormonmentes SH-tápoldatban mostuk kétszer, majd ebben a hormonmentes környezetben növesztettük tovább a sejteket, meghatározott időközönként mintát véve a kultúrából.

A különböző növényi hormon csoportokhoz tartozó hormonokkal való kezelés előtt a sejtszuszpenziót hormonmentes táptalajon tartottuk három táptalajcserén keresztül. Ezután a táptalajhoz hozzáadtuk a különböző hormonokat, külön-külön, a megfelelő koncentrációban, és így növesztettük a kultúrát két órán át. Ezután vettünk mintát az eltérően kezelt sejtszuszpenziókból a további vizsgálatokhoz.

5. Eredmények

5.1. Az *in situ* hibridizációs technika körülményeinek beállítása.

5.1.1. A növényi anyag fixálása és beágyazása.

A növényi anyag fixálásának célja a benne található nukleinsavak és fehérjék megóvása a lebomlástól és konzerválása a későbbi detektáláshoz. A legelterjedtebb fixáló oldatok, az aldehideket tartalmazók, amelyek keresztkötéssel fixálnak, és az alkohol tartalmú fixálók, amelyek hatása kicsapási reakción alapul. Az aldehidek jobban megőrzik a sejtben lévő RNS-eket, mint a kicsapási reakción alapuló fixálók. Ezen kívül a nukleinsavak hozzáférhetősége is kedvezőbb a

próba számára. Minél nagyobb a fixáló anyag koncentrációja a fixáló oldatban, annál jobban megőrzi a sejt szerkezetét eredeti állapotában. Viszont a sejtösszetevők hozzáférhetősége a próba számára ezzel a koncentráció növekedéssel arányosan csökken. Ezen körülmények figyelembevételével kísérleteinkben a gyökérgümők fixálásához 2% paraformaldehidet és 0.5% glutáraldehidet használtunk. A növényi anyagot 2-4 órán keresztül fixáltuk jégen, majd fokozatosan paraffinba ágyasztuk őket. A paraffin a legelterjedtebb olyan anyagok beágyazására, amelyekből később közepesen vékony metszeteket kívánunk előállítani. Jól megőrzi a szövetek szerkezetét, jó minőségű metszetek készíthetők a beágyazott anyagból és a paraffin könnyen eltávolítható a metszetekből a hibridizálás előtt. A paraffinba való beágyazáshoz a szövetekből először el kell távolítani a vizet, majd fokozatosan telíteni kell őket paraffinnal. Ehhez a szövetet emelkedő koncentrációjú paraffin oldatokba kell meríteni, és ezzel párhuzamosan növelni kell a hőmérsékletét. A paraffin a fokozatos adagolásnak köszönhetően tökéletesebben hatol be a szövetbe és ez javítja a későbbi metszetek minőségét. A hőmérséklet pontos beállítása kritikus lépés a beágyazás sikeressége szempontjából. Az általunk használt paraffin ideális hőmérséklet tartománya 58-62°C volt. Amennyiben a paraffint tartósan ennél magasabb hőmérsékletnek tesszük ki, elveszti szerkezetét és beágyazásra alkalmatlanná válik. Miután a gümőket átittattuk paraffinnal, a mintákat 4°C-ra helyeztük, hogy a paraffin megszilárduljon, majd metszeteket készítettünk a beágyazott növényi szövetből. A növényi anyag fixálásának és beágyazásának a menetét a 3. táblázat foglalja össze.

5.1.2. Metszetek készítése és előkezelése az *in situ* hibridizációhoz.

A paraffinba ágyazott gümőmintákból 8µm-es, közepesen vékony sorozat-metszeteket vágunk, mikrotom segítségével. A metszeteket poli-L-lizin borítású mikroszkóp tárgylemezekre helyeztük. A poli-L-lizin elősegíti a metszetek megtapadását a tárgylemezen és megelőzi leválásukat a hibridizáció folyamán. A tárgylemezeket 12 órán át 42°C-on szárítottuk a hibridizációs előkezelés előtt. Hibridizáció előtt először a paraffint távolítottuk el a metszetekből, majd a metszeteket vízzel telítettük a proteáz kezelés előtt. A metszetek proteázzal való kezelése a hibridizáció előtt lehetővé teszi a próba könnyebb behatolását a fixált szövetbe, és ezzel erősíti a hibridizációs jelet. Ehhez a kezeléshez kísérleteinkben ProteinázK-t használtunk. Az enzim töménységének, valamint az emésztés idejének meghatározása tapasztalati úton történik, és különböző típusú szövetek esetén igen eltérő lehet. A proteináz emésztés után a tárgylemezeket triethanolamint és anhidrin-savat tartalmazó oldatba merítettük, amely a későbbiekben megakadályozza a próba nem-specifikus kötődését a pozitív töltésű aminosavakhoz. Az így előkezelt metszeteket ismét dehidratáltuk, majd a tárgylemezeket

száraz körülmények között, 4°C-on tároltuk a hibridizáció kezdetéig. A hibridizációt megelőző kezelési lépéseket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Kezelés	Időtartam	Hőmérséklet
4% paraformaldehid 0.5% glutáraldehid 0.1M foszfát-puffer	2-4 óra	jégen
0.1M foszfát-puffer	2x10 perc	jégen
30% etanol	30 perc	jégen
50% etanol	30 perc	jégen
70% etanol	12-16 óra	4°C
80% etanol	30 perc	szobahő
90% etanol	30 perc	szobahő
100% etanol	2x30 perc	szobahő
75% etanol 25% 3-butanol	30 perc	szobahő
50% etanol 50% 3-butanol	30 perc	szobahő
25% etanol 75%3-butanol	30 perc	30°C
100% 3-butanol	30 perc	30°C
3-butanol 30°C-on paraffinnal telítve	4 óra 30 perc	30°C 42°C
3-butanol 42°C -on paraffinnal telítve	12-16 óra 30 perc	42°C 60°C
paraffin	72 óra (paraffint többször cserélni)	60°C

3. táblázat. A növényi anyag fixálásának és beágyazásának lépései az *in situ* hibridizálást megelőzően.

Kezelés	Időtartam	Hőmérséklet
Xilén	10 perc	szobahő
50% xilén 50% etanol	5 perc	szobahő
100% etanol	5 perc	szobahő
95% etanol	5 perc	szobahő
80% etanol	5 perc	szobahő
60% etanol	5 perc	szobahő
30% etanol	5 perc	szobahő
1XPBS	2x5 perc	szobahő
10µg/ml proteinázK 100mM Tris-HCl pH:7.5 50mM EDTA	30 perc	37°C
0.1M glicin 1XPBS	5 perc	szobahő
0.1M trietanolamin pH:8.0 0.25% anhidrin sav	10 perc	szobahő
30% etanol	2 perc	szobahő
60% etanol	2 perc	szobahő
80% etanol	2 perc	szobahő
95% etanol	2 perc	szobahő
100% etanol	2 perc	szobahő

4. táblázat. A növényi anyagból készített metszetek kezelése az *in situ* hibridizálást megelőzően.

5.1.3. A hibridizációs próba előállítása és az *in situ* hibridizálás.

Az *in situ* hibridizációs kísérletekben olyan RNS próbát használtunk, amelyet ^{35}S izotóppal jelöltünk. Ennek az izotópnak előnye, hogy nem túl erős a sugárzása, ami megkönnyíti a kezelését (próbaelőállítás, hibridizáció, sugárzó hulladék kezelése, stb.). Ezen túlmenően a hibridizáció felbontása jó (sejt szintű lokalizáció) és az exponálás ideje is elfogadható hosszúságú (2-6 hét). A másik két leggyakrabban használt izotóp az *in situ* hibridizációs kísérletekben a ^3H és a

^{32}P , ^3H izotóp esetében a kísérlet felbontóképessége igen jó, viszont az exponálási idő nagyon hosszú az izotóp kisebb specifikus aktivitása miatt. A ^{32}P izotóp használata nem ajánlott, mivel felbontó képessége túl alacsony, és használata különleges védőfelszerelés alkalmazását igényli, ami nehézkessé teszi a kísérlet elvégzését.

Az RNS próba előállítása *in vitro* transzkripció reakcióban történt. Ehhez a megfelelő DNS szakaszokat pBluescript plazmid poli-linker helyére klónoztuk. Ez a plazmid a poli-linker két végén két különböző RNS polimeráz felismerő helyet tartalmaz (T3 és T7 RNS polimeráz felismerő helyek). Így a transzkripció mindkét irányban elvégezhető. Az *in situ* hibridizáció során a jellemezni kívánt mRNS-sel kiegészítő szekvenciájú RNS-t (antisens) használtunk próbaként. A DNS-t az *in vitro* transzkripció előtt a megfelelő restrikciós enzimmel linearizáltuk, így elkerültük a plazmid átírását, ami nem-specifikus hibridizációhoz vezethet. $1\mu\text{g}$ linearizált DNS-t használtunk a próba előállításához, amelyet a transzkripciós csomaghoz tartozó leírás alapján végeztük (Pharmacia). Az RNS jelöléséhez $100\mu\text{Ci}$ ^{35}S -tel jelölt UTP-t (Amersham) használtunk, valamint nem-jelölt UTP-t is adtunk a reakcióhoz 0.1mM végkoncentrációban. A transzkripció befejezte után DNázl-gyel kezeltük az elegyet, ami megemésztette a reakcióban használt DNS-t. Ezután a próbát Sephadex G75 oszlopon választottuk el a be nem épült nukleotidoktól. Ezt követően a tisztított próbát alkáli körülmények között a hibridizációhoz megfelelő hosszúságúra hidrolizáltuk. A jelölt RNS-hez azonos térfogatú hidrolizáló oldatot ($120\text{mM Na}_2\text{CO}_3$, 80mM NaHCO_3) adtunk és 60°C -on hidrolizáltuk a kiszámított ideig. A hidrolizálási idő kiszámításához a következő képlet áll rendelkezésre:

$$t = \frac{L_o - L_f}{0.11 \times L_o \times L_f}$$

ahol t a hidrolízis ideje; L_o a próba eredeti hossza a transzkripció után; L_f pedig a kívánt próbahossz. Az ideális próbahossz az *in situ* hibridizációhoz $150\text{--}200\text{ bp}$. A próba megfelelő hossza két szempontból is jelentős a hibridizáció során. Amennyiben a próba túl hosszú, úgy nehezen képes csak behatolni az előkezelt metszetekbe, ami csökkenti a hibridizációs jelet. Amennyiben a próba túl rövid, megemelkedik a nem-specifikus hibridizációs jel erőssége, amely a specifikus hibridizációs jel érzékelését megnehezíti.

A tisztított és hidrolizált próbát hibridizációs pufferben hígítottuk kívánt töménységűre. A kísérletekben a próbát általában 10^5 cpm/metszet koncentrációban használtuk. A hibridizáció specifikusságának ellenőrzésére az RNS próbát specifikus, nem jelölt DNS-sel kevertük, ami a próbával vetélkedett az érzékelni kívánt RNS-hez való kötődésben. Amennyiben a hibridizáció specifikus, úgy a DNS-sel kevert próba alkalmazása esetén a hibridizációs jel jóval gyengébb. $100\mu\text{l}$ hibridizációs puffer-próba keveréket mértünk mindegyik metszetre és parafilmmel borítottuk

be őket, ami egyrészt elősegítette a hibridizációs elegy egyenletes eloszlását a metszeteken, másrészt megelőzte a puffer elpárolgását és a próba betöményedését.

A tárgylemezeket 100% nedvességtartalom mellett, 42°C -on inkubáltuk 12 órán keresztül. Hibridizáció után a metszeteket többször mostuk, és RNázzal kezeltük. Mindkét kezelés célja a mRNS-hez nem kötődött, jelölt RNS próba eltávolítása volt, ami csökkenti a nem-specifikus hibridizációs jel erősségét. A hibridizáció utáni kezeléseket az 5. táblázatban foglaltuk össze.

Kezelés	Időtartam	Hőmérséklet
4XSSC 5mM DTT	3x15 perc	szobahő
10mM Tris-HCl pH:7.5 5mM EDTA	10 perc	37°C
10mM Tris-HCl pH:7.5 5mM EDTA 20µg/ml RNázA	30 perc	37°C
0.2XSSC 5mM DTT	3x15 perc	63°C

5. táblázat. A metszetek kezelése az *in situ* hibridizációt követően.

5.1.4. A hibridizációs jel detektálása.

Az *in situ* hibridizációt követő mosási lépések után a tárgylemezeket egyenként fotóemulzióba (Amersham) mártottuk, majd rövid szárítás után sötét dobozba helyeztük és így tároltuk őket 4°C -on az előhívásig (3-5 hét). A fotóemulzióval borított metszeteket előhívás után vízzel öblítettük, majd a tárgylemezekre Moviol oldatot tettünk és fedőlemezzel fedtük be őket. A hibridizációs jel érzékeléséhez normál fénymikroszkópot és sötét-mezőjű (dark-field) mikroszkópot használtunk. Normál fénnel mehvilágítva, a hibridizációs jel fekete szemcsés lerakodásként jelenik meg, míg a sötét mezőjű mikroszkópot használva fényes szemcsék mutatják a hibridizációs jelet.

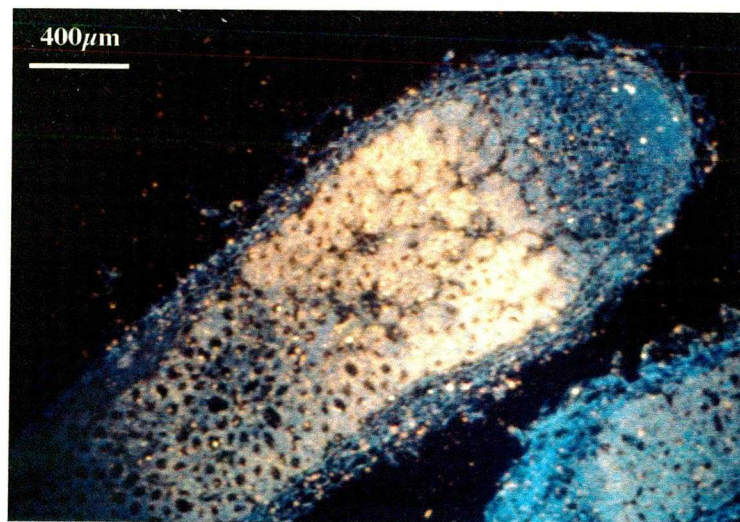
5.1.5. A *Medicago sativa* leghemoglobin génjének térbeli kifejeződése lucerna gyökérgümőben.

A lucerna leghemoglobin génje egy nagy mennyiségben termelődő késői nodulin gén (lásd 2.4.3. fejezet). Ezt a gént választottuk az *in situ* hibridizációs kísérlet körülményeinek beállításakor, mint kontrol gént, mivel nagy mennyiségben termelődő mRNS-e könnyen kimutat-

ható a gyökérgümőben. A lucerna leghemoglobin gén kódoló szakasza pBluescriptKS⁺ plazmidba, *Eco*RI-*Xho*I helyre volt klónozva. A kiegészítő szálú RNS próba előállításához a plazmidot *Hind*III restrikciós enzimmal lineárizáltuk. A gén jelenlétét aktívan nitrogént kötő lucerna gyökérgümőkben vizsgáltuk.

Mint az a 6. ábrán látható, a gümő megőrizte az indeterminált gümőkre jellemző szerkezetét és a leghemoglobin gén kifejeződése is kimutatható volt az aktívan nitrogént kötő gümőkben. Hibridizációs jelet csak a gyökérgümő nitrogén kötő zónájában érzékelünk. A hibridizációs jel erős volt, annak bizonyítékául, hogy a leghemoglobin mRNS nagy mennyiségben termelődik ebben a részében a gümőnek. Ez az eredmény alátámasztja a korábbi Northern hibridizációs kísérletek eredményét, miszerint a leghemoglobin gén kifejeződése a lucerna gümőben a nitrogén kötés kezdetén aktiválódik, és nagy mennyiségben termelődik a nitrogénkötés alatt is. Az *in situ* hibridizáció eredménye bizonyítja, hogy:

- a fixálási és beágyazási lépések után a gümő megőrizte jellemző szerkezet, valamint a benne kifejeződő mRNS-ek is konzerválódtak.
- a hibridizációt megelőző előkezelések lehetővé tették a próba behatolását a vizsgált szövetbe, és a specifikus hibridizációt.
- a próba jelölése során a jelölt nukleotidok hatékonyan beépültek a szintetizált RNS-be.
- a próba hossza megfelelően rövid volt ahhoz, hogy a próba hatékonyan behatoljon a metszetekbe, és elég hosszú volt ahhoz, hogy specifikusan kimutassa a kívánt gén kifejeződésének térbeli eloszlását.
- a hibridizáció utáni kezelések hatékonyan eltávolították a nem-specifikus hibridizációs jelet.



6. ábra. A leghemoglobin késői nodulin gén térbeli kifejeződésének kimutatása *in situ* hibridizációval, *Rhizobium meliloti* 41-gyel fertőzött *Medicago sativa* ssp. *sativa* Sittel gyökéren képződött gyökérgümőben, 21 nappal a fertőzés után. A hibridizációs jel érzékeléséhez sötét mezőjű mikroszkópot használtunk.

5.2. A *Medicago sativa enod12* korai nodulin génjének jellemzése (1. és 2. publikáció).

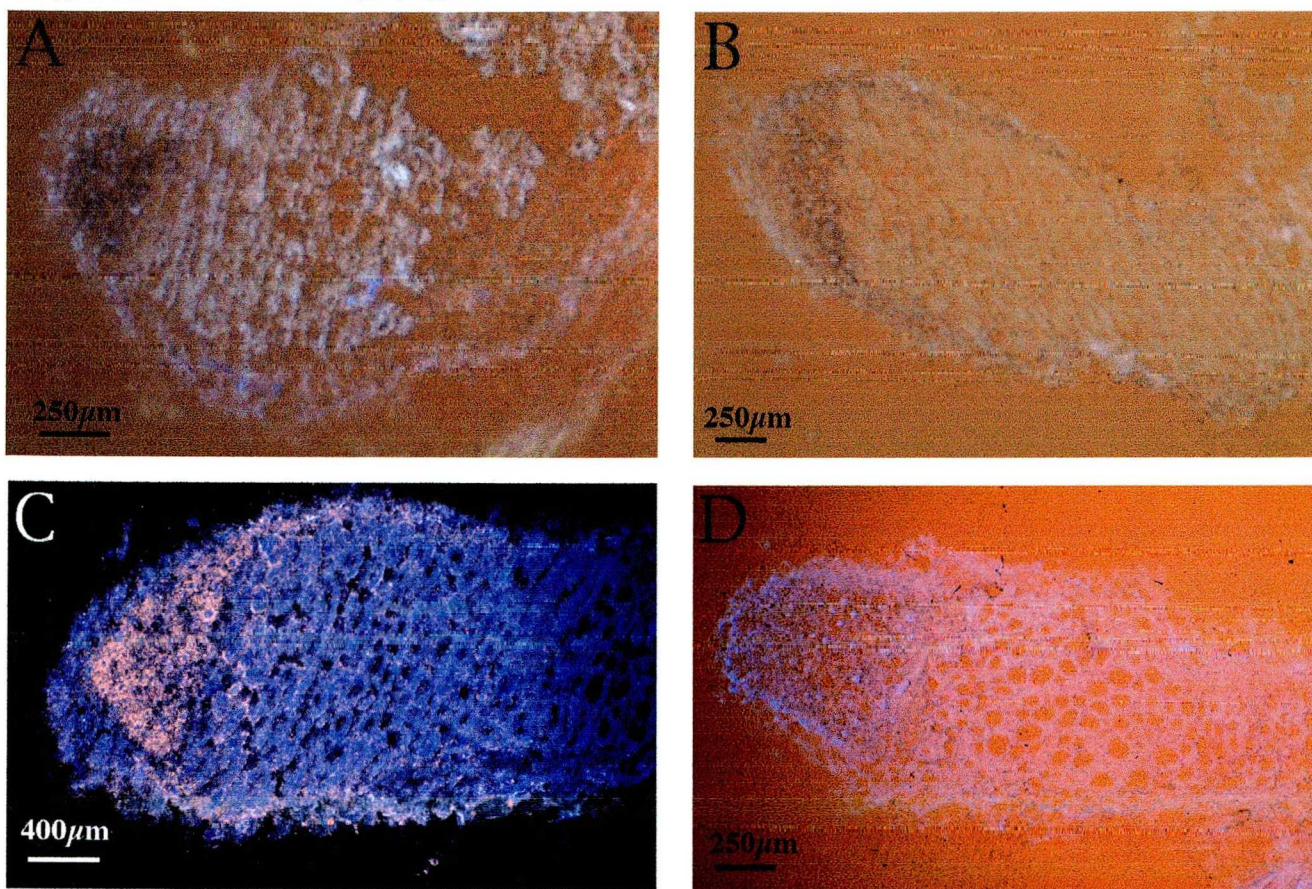
1. publikáció: Petra Bauer, Martin D. Crespi, **Judit Szécsi**, Lori A. Allison, Michael Schultze, Pascal Ratet, Éva Kondorosi and Ádám Kondorosi. (1994). Alfalfa *enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. Plant Physiology 105: 585-592

2. publikáció: Gyula Csanádi, **Judit Szécsi**, Péter Kaló, Péter Kiss, Gabriella Endre, Ádám Kondorosi, Éva Kondorosi and György, B. Kiss. (1994). *ENOD12*, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. Plant Cell 6, 201-213.

5.2.1. A *Msenod12* térbeli kifejező désének vizsgálata lucerna gyökérgümőben.

Az *enod12* gén korai nodulin gén jellemzésének első lépéseként a gén térbeli kifejeződését vizsgáltuk a diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* w2 (Mcw2), illetve a tetraploid *M. sativa* spp. *sativa* cv. Sitel (Ms Sitel) növényeken képződött különböző korú gyökérgümőkben *in situ* hibridizációs technika segítségével. Hibridizációs próbaként az *Msenod12B* gént választottuk (Allison és mtsai., 1993). Mivel a *M. sativa*-ból izolált két *enod12* gén csak kis mértékben tér el egymástól, így térbeli kifejeződésük elkülönítése *in situ* hibridizációval nem lehetséges. Az általunk választott próba mind az *enod12A* génnel, mind az *enod12B* génnel hibridizál. Az *Msenod12B* gént pBluescript SK⁺ plazmidba klónoztuk, *EcoRV* helyre, a T3 promóter felől kezdődően. A plazmidot *EcoRI* restrikciós enzimmel linearizáltuk a transzkripciót megelőzően, és az *enod12* mRNS-sel kiegészítő szekvenciájú jelölt RNS próbát T7 RNS polimeráz alkalmazásával állítottuk elő. Az *enod12* gén térbeli kifejeződését 7 és 20 napos gyökérgümőkben vizsgáltuk. Az eredményt a 7. ábra mutatja be.

Az *Msenod12* gén kifejeződése mind a két gazdanövény (Mcw2 és Ms Sitel) esetében azonos mintázatot mutatott. A különböző korú gyökérgümőkben erős hibridizálási jel figyelhető meg közvetlenül az osztódó szövet mögött, az inváziós (elő-fixációs) zónában. Emellett gyenge hibridizációs jel volt megfigyelhető a gümő kéregsejtjei mentén. A különböző korú gümők esetében eltérés a hibridizáló zóna kiterjedésében volt. A 7 napos gümőknek csaknem felében volt erős az *enod12* kifejeződése, mivel ezek a gyökérgümők a fertőzés korai stádiumában vannak és infekciós zónájuk aránya a gümőn belül nagyobb. Idősebb gümőkben az aktiv nitrogénkötő zóna foglalja el a gümő térfogatának nagy részét, az inváziós zóna mérete ugyan megegyezik a fiatal gümőben található inváziós zóna méretével, aránya azonban a gümőn belül, a szimbiotikus zónához, és a gümő méretéhez viszonyítva lecsökken.



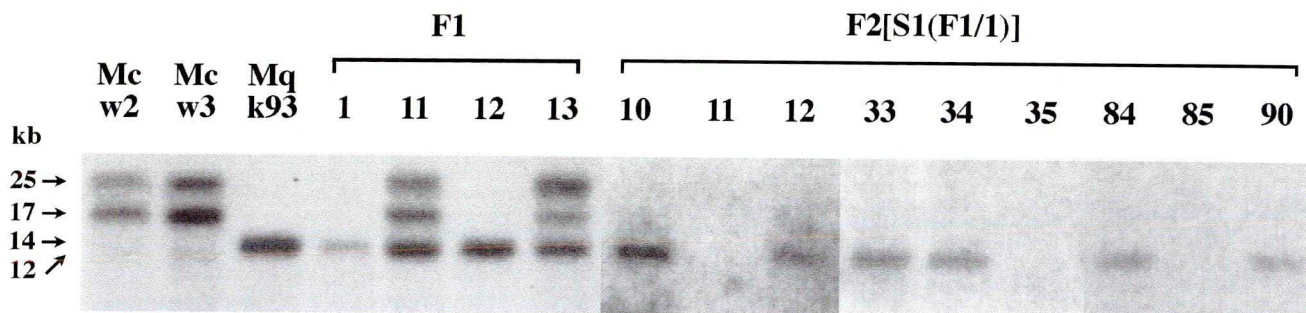
7. ábra. Az *enod12* korai nodulin gén térbeli kifejeződésének kimutatása különböző korú lucerna gyökérgümőben, *in situ* hibridizációval. **A.** Az *enod12* térbeli kifejeződése *Medicago sativa* ssp. *sativa* növényen képződött 7 napos gümőben, fénymikroszkóp. **B.** *enod12* térbeli kifejeződése *Medicago sativa* ssp. *sativa* növényen képződött 21 napos gümőben, fénymikroszkóp. **C.** *enod12* térbeli kifejeződése *Medicago sativa* ssp. *sativa* növényen képződött 21 napos gümőben, sötét mezőjű mikroszkóp. **D.** *enod12* térbeli kifejeződése *Medicago sativa* ssp. *coerulea* növényen képződött 21 napos gümőben, fénymikroszkóp.

5.2.2. Az *enod12* gén öröklődésének nyomon követése diploid *Medicago* fajok keresztezése során.

Kísérleteinkben két diploid *Medicago* fajban, a *M. sativa* ssp. *quasifalcata* k93 (Mqk93) és a *M. sativa* ssp. *coerulea* w2 (Mcw2) növényekben vizsgáltuk az *enod12* korai nodulin gén jelenlétét. Ezután a két diploid fajt szülőként használva, az ezek keresztezéséből származó F1 és F2 generáció növényeiben követtük nyomon a gén öröklődését. A vizsgált növényekből DNS-t nyertünk ki, majd ezt a DNS-t használtuk Southern hibridizációs, valamint PCR kísérletekben az *enod12* gén jelenlétének kimutatására.

A Southern hibridizációhoz a növényekből kinyert genomi DNS-t *EcoRI* restrikciós enzimmal emésztettük, a különböző méretű DNS darabokat agaróz gélen választottuk el egymástól,

majd hibridizációs membrára vittük át őket. Az *enod12* gén jelenlétének kimutatásához hibridizációs próbaként az *Msenod12A* gén egy PCR reakcióban amplifikált szakaszát használtuk, amit ^{32}P -vel jelölt izotóppal jelöltünk. A Southern hibridizáció eredményét a 8. ábra foglalja össze. A szülőként használt két diploid *Medicago* faj eltérő hibridizálási mintát mutatott. Az *enod12* próba a Mcw2 genomban három különböző méretű DNS darabhoz hibridizált. Ebből két hibridizációs csík erősebb volt, az egyik kb. 25kb, a másik kb. 17kb nagyságú. A harmadik, gyengébben hibridizáló DNS darab méretét 12kb-ra becsültük. Ennek a hibridizálási csíknak az erőssége az egyre specifikusabb hibridizációs körülmények alkalmazásával gyengült. Ebből arra következtettünk, hogy a Mcw2 genomban a két erősebben hibridizáló DNS darab hordozza az *enod12* géneket, míg a harmadik, gyengébb hibridizálást mutató DNS darab valószínűleg egy hasonló génnel való kereszt-hibridizálás eredménye. A másik szülő, az Mqk93 DNS-ének egyetlen darabjához hibridizált az *enod12* próba. Ennek a DNS darabnak a mérete 14kb volt. Ez azt mutatja, hogy a Mqk93 fajban valószínűleg csak egy *enod12* gén van. Egy másik magyarázat a két fajta között az *enod12* gének számában kimutatott különbségre, hogy a Mcw2 faj egy *EcoRI* restrikciós enzim hasító helyet tartalmaz az *enod12* genomi szakaszán, míg a Mqk93 nem tartalmazza ezt a hasító helyet.

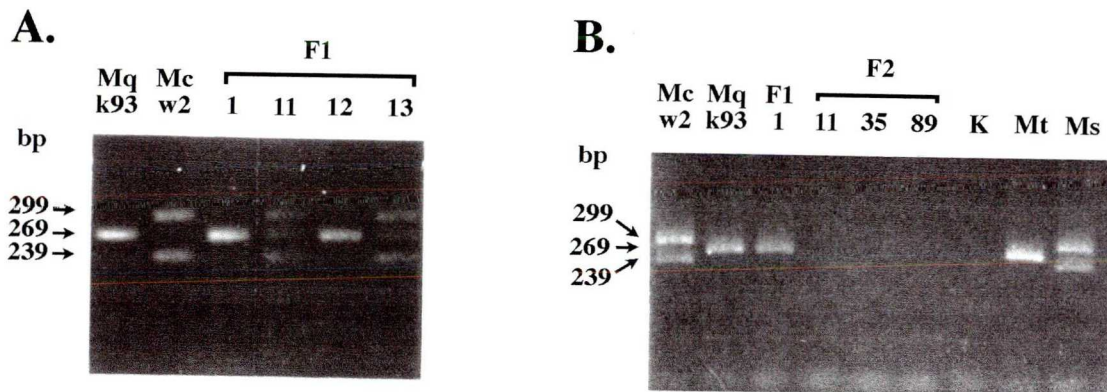


8. ábra. *enod12* homológ szekvenciák kimutatása a diploid *Medicago sativa* ssp. *coerulea* w2 és w3 (**Mcw2 és Mcw3**), *M. sativa* ssp. *quasifalcata* k93 (**Mqk93**) szülői növényekben, az ezek keresztezéséből származó **F1** generáció néhány növényében, valamint az F1/1 növény önbeporzásából származó **F2** populáció egyes növényeiben, Southern hibridizációval.

Az Mqk93 (anyai) és Mcw2 (apai) keresztezéséből származó F1 generáció növényei esetében azt tapasztaltuk, hogy az F1 generáció bizonyos tagjai mindhárom *enod12*-t hordozó DNS darabot örökölték, vagyis három hibridizálási csíkot érzékeltünk. Ezek mérete a szülőben

kimutatott DNS darabok méretével megegyezett (25kb, 17kb és 14kb). Az F1 generáció más tagjainak azonban csak egyetlen DNS darabjához hibridizált a próba. Ennek a mérete megegyezett a Mqk93-as szülőben meghatározott hibridizációs csík méretével (14kb). Ebből arra következtettünk, hogy az F1 generáció ezen egyedei csak az anyai *enod12* allélt örökölték.

A Southern hibridizációt követően PCR reakció segítségével ellenőriztük az *enod12* gén kópia számát a két szülő, valamint az F1 nemzedék növényeiben. A reakcióban nyert amplifikációs termékeket 1.5%-os agaróz gélen választottuk el egymástól. Az kísérlet eredménye a 9. ábrán látható. Mcw2 esetén két amplifikációs terméket különítettünk el: a nagyobb mérete 299bp, a kisebbé 239bp volt. Ezeknek az amplifikációs termékeknek a mérete megegyezik a tetraploid *M. sativa ssp sativa* fajta DNS-éből amplifikálható *enod12* PCR termékek méretével. Mqk93-ból egyetlen terméket sikerült elkülönítenünk; ennek mérete 269bp volt. Ez a méret azonos a diploid *M. truncatula* DNS-éből azonos oligonukleotidokkal amplifikálható termék méretével. Ezekből az eredményekből, azt a következtetést vontuk le, hogy a diploid Mcw2, a *M.s. ssp sativa*-hoz hasonlóan, két *enod12* gént tartalmaz, míg a Mqk93 a *M. truncatula*-hoz hasonlóan, csak egyet.



9. ábra. Az *enod12* gén öröklődésének nyomonkövetése *Medicago* növényekben PCR amplifikálással. **A,** A különböző méretű *enod12* amplifikációs termékek kimutatása a szülői Mcw2 és Mqk93 növényekben, valamint az ezek keresztezéséből származó F1 generáció néhány egyedében. **B,** A szülői, az F1/1 és az F2 generáció néhány növényéből, valamint *Medicago truncatula* és *M. sativa* növényekből PCR reakcióban amplifikálható *enod12* termékek méretének összehasonlítása. **Mcw2:** *Medicago sativa ssp coerulea* w2; **Mqk93:** *M. sativa ssp quasifalcata* k93; **F1:** a Mcw2 és Mqk93 keresztezéséből származó nemzedék növényei; **F2/11 és F2/35:** az F1/1 növény önbeporzásából származó nemzedék két *enod12* genotípusú növénye, **Mt:** *M. truncatula*, **Ms:** *M. sativa ssp sativa*; K: kontroll PCR reakció DNS hozzáadása nélkül.

Az F1 generáció azon növényeiből, amelyekben Southern hibridizációval három hibridizációs csíkot érzékeltünk, három PCR terméket sikerült elkülönítenünk. Ezek mérete 299bp, 269bp és 239bp volt. Azokból az F1-es növényekből, amelyekben a Southern hibridizációval csak egy hibridizációs csíkot érzékeltünk, a PCR reakció után is csak egy terméket sikerült elkülönítenünk, amelynek mérete 269bp volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy minden F1 generáció beli növény örökölte az anyai vonal egyetlen *enod12* allélját, viszont az apai vonalból származó két *enod12* gént csak néhány egyed örökölte. Ennek a megfigyelésnek a magyarázatául azt feltételeztük, hogy a Mcw2 valószínűleg heterozigóta az *enod12* génre nézve. Az egyik kromoszóma párján jelen van a két *enod12* gén, míg a másíkról hiányzik (null allél). Azok a növények, amelyekben csak az anyai *enod12* volt kimutatható, apai ágról feltehetően a null allélt örökölték.

Ennek a feltételezésnek az igazolására kiválasztottunk egy olyan F1 generációból származó növényt (F1/1), amelyből csak az anyai Mqk93 *enod12* volt kimutatható. Az F1/1 egyed önbeporzásával állítottuk elő az F2[S1(F1/1)] generációt, amelynek tagjaiban vizsgáltuk az *enod12* gén öröklődését. Az F2 generáció tagjaiból DNS-t nyertünk ki, majd Southern hibridizációs és PCR amplifikációs technikával vizsgáltuk az *enod12* jelenlétét és kópia számát az egyedekben. A Southern hibridizáció a legtöbb egyedben kimutatta a Mqk93-ból származó egyetlen *enod12* gént, azonban néhány növényből (például F2/11, F2/35) a gén egyáltalán nem volt kimutatható (8. ábra). Az *enod12*-t nem tartalmazó egyedekből PCR amplifikációs kísérletekben sem sikerült az *enod12*-nek megfelelő amplifikációs terméket elválasztani (9. ábra), amiből arra következtettünk, hogy ezek az egyedek csak az apai null allélt örökölték. A null allélok a Mendeli recesszív génnek szabályainak megfelelően, stabilan öröklődtek, és az általunk vizsgált *enod12⁻* genotípusú növényekből többszöri vegetatív szaporítás után sem volt kimutatható az *enod12* jelenléte. Ezek az eredmények megerősítik a korábbi feltételezést, miszerint az Mcw2 az egyik kromoszómájáról hiányzik az *enod12* gén.

5.2.3. Az *enod12* hiányának hatása a gümőképződésre és a nitrogénkötésre.

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy az eltérő mennyiségű *enod12* allél a különböző növényekben milyen hatással van az adott egyed gümöszervezetének kialakítására, illetve a nitrogénkötésre. Ezekhez a vizsgálatokhoz a következő növényeket választottuk: Mcw2 apai vonalat, amely két *enod12* gént tartalmaz, valamint egy null allélt hordoz; az Mqk93 anyai vonalat, amely egy-egy *enod12* gént hordoz mindkét kromoszóma párján; az F1/1 növényt, amely anyai oldalról egy *enod12* gént, az apai oldalról a null allélt örökölte; az F2 generáció két növényét (F2/11 és F2/35), amelyek csak a null allélt örökölték és nem tartalmazták az *enod12* gént. A növényeket *Rhizobium meliloti* 41 baktérium törzzsel (Bánfalvi és mtsai., 1981) fertőztük, és nyomon követtük a gyökérgümők kialakulását. Az eltérő kópiaszámú *enod12*-t tartalmazó

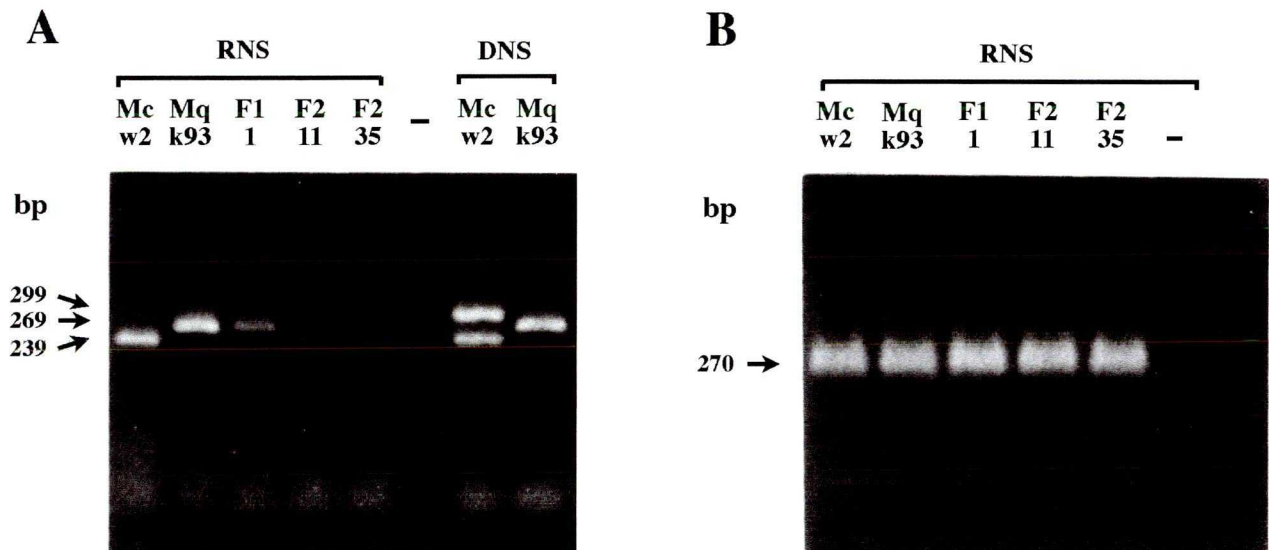
növényeken a gümők kifejlődésének időbeli lefolyása azonos volt, és a gümők külső fenotípusában sem találtunk jelentősebb különbséget (10. ábra). Annak ellenőrzésére, hogy a gümőkben az *enod12* kifejeződése követi-e növények genomjában kimutatott eltérést, RT-PCR módszerrel vizsgáltuk az *enod12* kifejeződését a különböző növényeken fejlődött gümőkben, a fertőzés után 21 nappal (11. ábra). Az Mqk93, Mcw2 és az F1/1 növények gümőiből származó RNS mintákból egyetlen amplifikációs terméket sikerült elkülönítenünk. Az Mqk93 és az F1/1-ről származó gümők esetében az egyetlen termék mérete megegyezett a DNS-ükből amplifikálható termék méretével (269bp). Az Mcw2 növényeken képződött gümők esetében az egyetlen amplifikációs termék mérete megegyezett a növény DNS-éből amplifikálható kisebb termék méretével (239bp). Az *enod12*⁻ növényeken képződött gümők RNS-ének használatakor semmilyen amplifikációs terméket nem sikerült kimutatni. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy az *enod12*-nek megfelelő amplifikációs termék hiánya a kinyert RNS minta nem megfelelő minőségének köszönhető az előzőekben alkalmazott körülmények között PCR reakciót végeztünk el a RNS mintákon az *msc27* gén (lásd alább) amplifikálásához szükséges oligonukleotidokat használva. Mint az a 11. ábrán látható, az *msc27*-nek megfelelő amplifikációs termék az összes növény esetén kimutatható volt a gümőkből.

A különböző növényeken fejlődött gümők szerkezetének vizsgálatához a gümőket paraformaldehidet tartalmazó oldatban fixáltuk, majd speciális, vékony metszetek készítésére alkalmas műanyagba ágyasztuk őket (Csanádi és mtsai., 1994). Az így elkészített mintákból 2µm vastagságú metszeteket készítettünk, és a metszeteket fénymikroszkóp alatt elemeztük. Megállapítottuk, hogy az *enod12*-t nem tartalmazó növényeken képződött gümők szerkezete megegyezik a vad típusú gümők szerkezetével. Kimutatható volt bennük az indeterminált gümőkre jellemző összes gümőzóna (12. ábra). Az aktív nitrogénkötő zónában a sejtek telítve voltak bakteroidokkal és közöttük kimutatható volt az infekciós fonál jelenléte. Utolsó lépésként a különböző növényeken képződött gümők nitrogénkötését hasonlítottuk össze acetilén-redukáló képességük alapján. Az F1/1 növényeken képződött gyökérgümők nitrogén fixáló képességét 100%-nak véve, a F2/11-é 129%, míg a F2/35-é 79% volt.

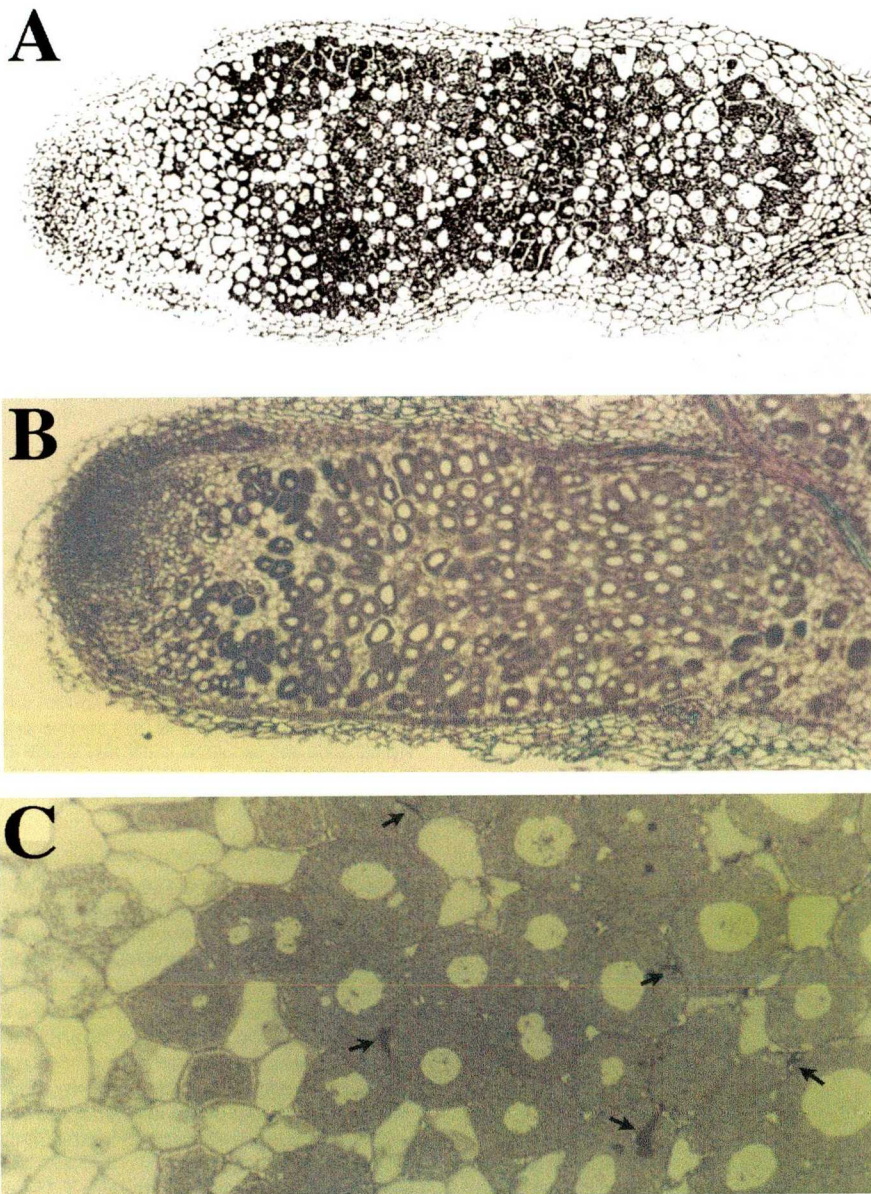
Mc Mq F1 F2
w2 k93 1 11



10. ábra. Különböző *enod12* allélokat hordozó növényeken képződött gyökérgümők fenotípusa *Rhizobium meliloti* 41-gyel való fertőzés után. **Mqk93:** *Medicago sativa* ssp *quasifalcata* k93; **Mcw2:** *M. sativa* ssp *coerulea* w2; **F1/1:** a Mcw2 és Mqk93 keresztezéséből származó növény, amely csak az anyai *enod12* gént örökölte; **F2/11:** az F1/1 növény önbeporzott populációjának egy olyan növénye, amely *enod12*⁻ genotípusú.



11. ábra. Az *enod 12* gén kifejeződésének kimutatása a vizsgált növényeken képződött gyökérgümőkben, RT-PCR reakcióval, és az amplifikációs termékek méretének összehasonlítása a DNS-ükből amplifikálható PCR termékek méretével (**A**). Az azonos körülmények között az *msc27* oligonukleotidokkal elvégzett RT-PCR reakció amplifikációs termékeinek kimutatása (**B**). **Mqk93:** *Medicago sativa* ssp *quasifalcata* k93; **Mcw2:** *Medicago sativa* ssp *coerulea* w2; **F1/1:** a Mcw2 és Mqk93 keresztezéséből származó növény, amely csak az anyai *enod12* gént örökölte; **F2/11** és **F2/35:** az F1/1 növény önbeporzott populációjának két *enod12*⁻ genotípusú növénye.



12. ábra. Normál gümőfejlődés az *enod12* hiányos növényeken. **A**, Vad típusú, *Medicago sativa*-n képződött indeterminált gyökérgümő belső szerkezete. **B**, Az F2/11 növényen képződött gyökérgümő belső szerkezete 21 nappal a *Rhizobium meliloti* 41-gyel való fertőzés után **C**, A B ábrán látható gümő átmeneti zónájának és szimbiótikus nitrogénkötő zónájának felnagyított részlete. A nyilak a bakteroidokkal telt, fertőzött sejtek közötti infekciós fonalat jelölik.

5.3. Lucernából izolált ciklin gének jellemzése (3. és 4. publikáció)

3. publikáció: Judit Szécsi, Arnould Savouré, Attila Fehér, Damla Dedeoglu, János Györgyey, Spencer Brown, Dénes Dudits, Ádám Kondorosi and Éva Kondorosi (1994). Isolation and characterization of *Medicago* cyclin genes. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation conference, Eds. Kiss G.B. and Endre G., Officina press, Szeged, Hungary, pp. 331.

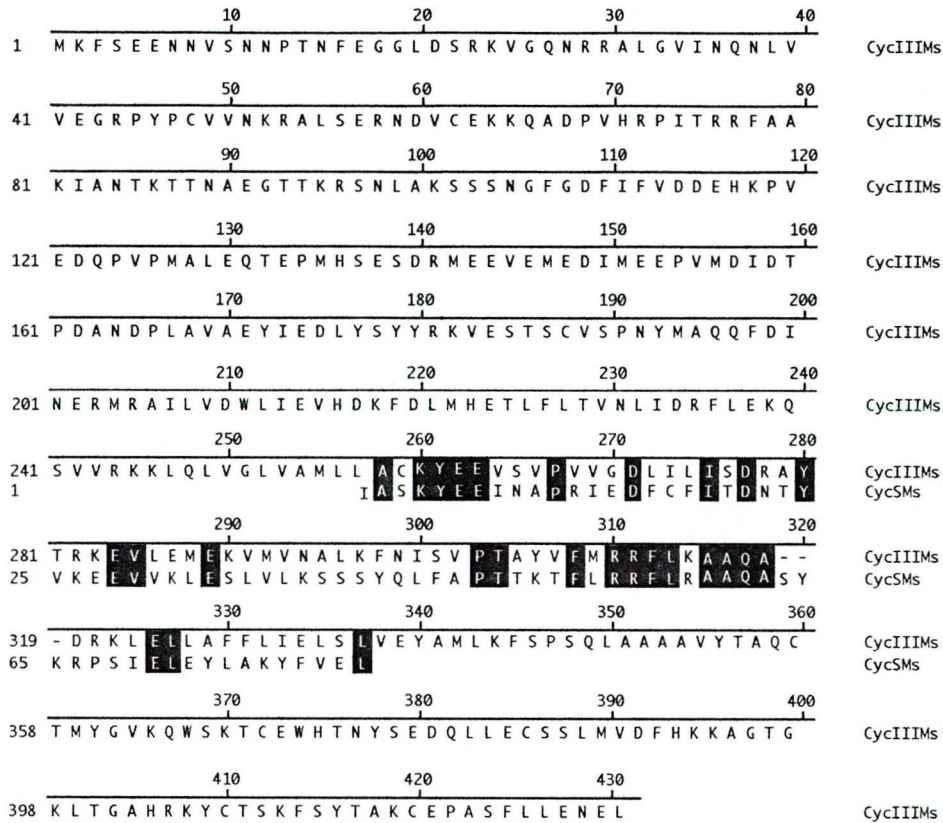
4. publikáció: Arnould Savouré, Attila Fehér, Péter Kaló, György Petrovics, Gyula Csanádi, Judit Szécsi, György B. Kiss, Spencer Brown, Ádám Kondorosi and Éva Kondorosi (1995). Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone *CyclIIIs* from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. Plant Mol. Biol. 27, 1059-1070.

5.3.1. A lucerna *CyclIIIs* és *CycSMs* ciklinjének összehasonlítása: szekvenciaelemzés.

Míg az előző fejezetben jellemzett korai nodulin gén, az *enod12* valószínűleg a Nod faktorok hatására beinduló új sejttal szintézist és az infekciós fonál kialakulását jelöli, addig a különböző ciklinek a szintén Nod faktorok hatására újra induló sejtosztódási ciklus és a gümő primordium kialakulásának markerei a gümőfejlődés során. A sejtosztódási ciklus újra indulása elengedhetetlen feltétele a gümő kialakulásának. Determinált gümők esetén a sejtosztódás aktiválása ideiglenes, ami után a sejtek visszatérnek a nem osztódó, differenciált állapotukba. Így a sejtosztódás, és a korai nodulin gének kifejeződése időben elkülönül a nitrogénkötés fázisától. Az indeterminált gümők esetén azonban a merisztéma sejtosztódási aktivitása a gümő egész élete során fennmarad, ami által az új sejtek képződése a gümő merisztémájában, és a korai nodulin gének kifejeződése a gümő egyéb részeiben, valamint a nitrogénkötés folyamata térben különül el, egy azon gümőn belül.

Munkám során két, a lucerna sejtosztódási ciklusában szerepet játszó ciklin gén jellemzésében vettem részt. Ezek szekvenciájának összehasonlítása a 13. ábrán látható. A *CyclIIIs* az első teljes hosszúságú lucernából (*M. sativa* ssp *varia*) izolált ciklin cDNS, amely a szekvenciája alapján hasonlóságot mutat az állatokban jellemzett A- és B-típusú ciklinekhez. Szekvenciájában megtalálható az úgynevezett ciklin "mag" szekvencia a ciklin boxszal, amely a CDK-hoz való kötődésben játszik szerepet. Ezen túlmenően a *CyclIIIs* az N-terminálisán hordozza a mitotikus ciklinekre jellemző destruktív boxot, amely a fehérje ubiquitin-közvetített úton történő lebomlását biztosítja az M-fázis végén (Savouré és mtsai., 1995). A másik ciklin gén, a *CycSMs* nem volt teljes hosszúságú cDNS. A rendelkezésünkre álló PCR amplifikálásból származó rész a fehérje ciklin box-án belül a C-terminális végnek felel meg. A két ciklin fehérje

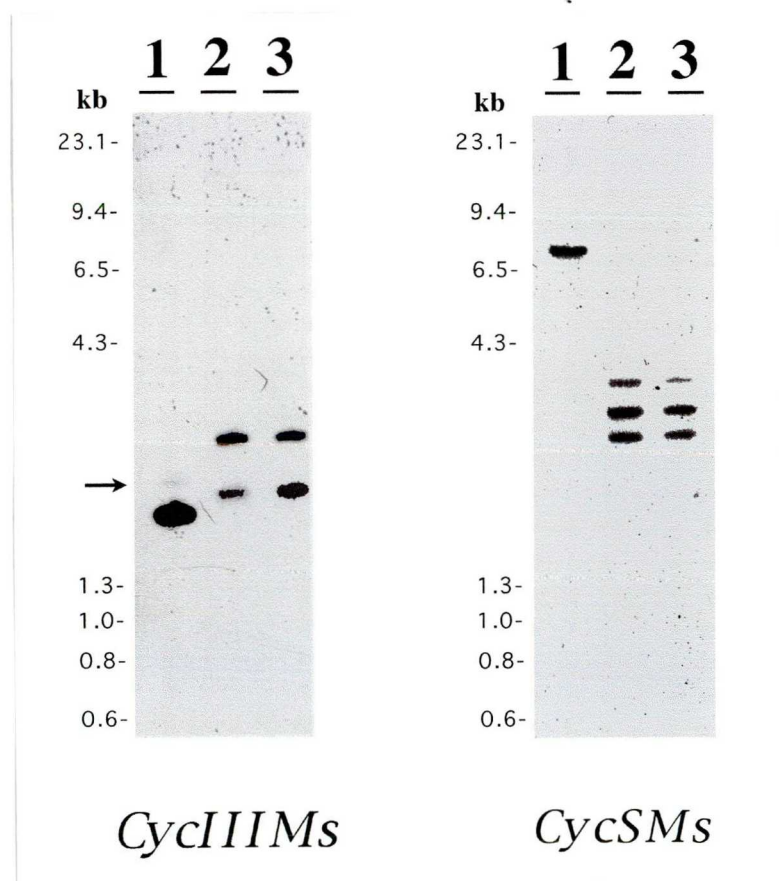
szekvenciája mindössze 30%-ban egyezik meg egymással. Az összehasonlításuk után feltételeztük, hogy a *CyclIIIMs* és *CycSMs* a ciklinek két különböző alcsoportjába tartozik.



13. ábra. A *CyclIIIMs* teljes hosszúságú ciklin és a *CycSMs* részleges ciklin aminosav szekvenciájának összehasonlítása. A megegyező aminosavak a fekete négyzetekben vannak feltüntetve.

5.3.2. A *CyclIIIMs* és

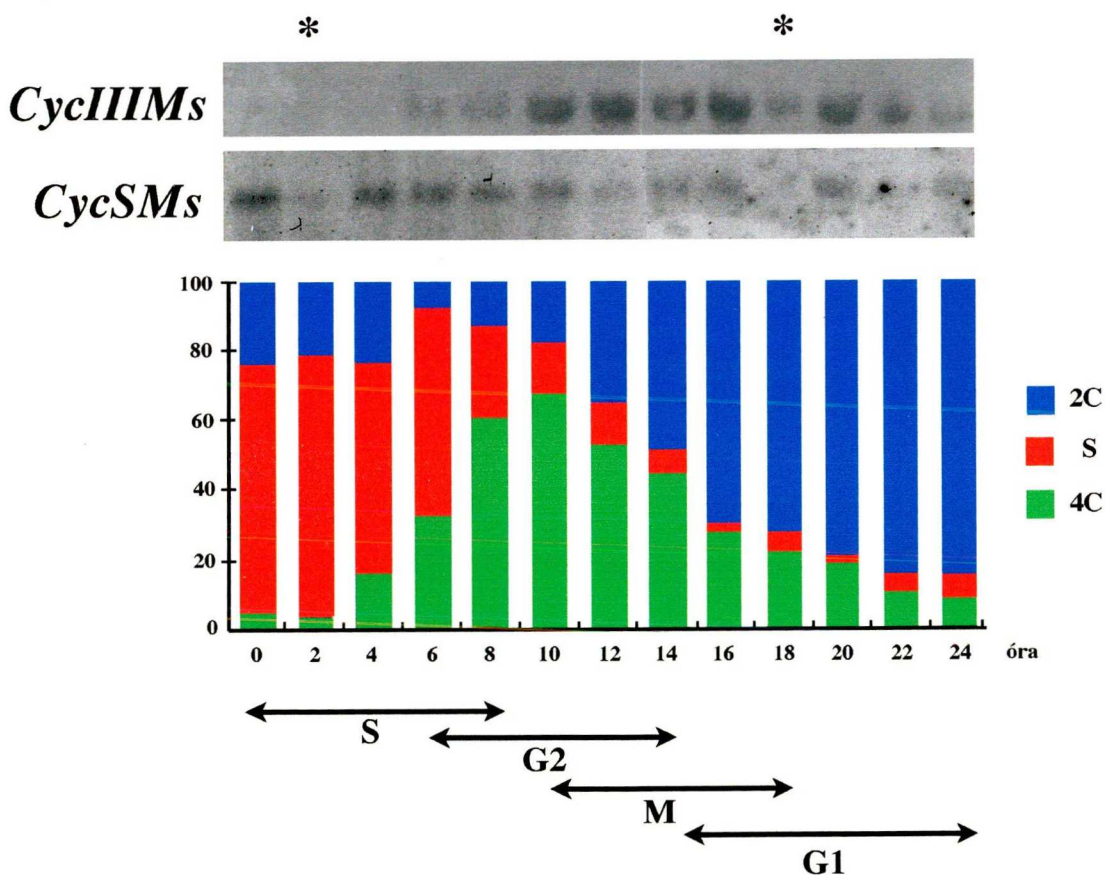
hibridizálás után. Ez arra enged következtetni, hogy a diploid önbeporzó *M. truncatula* genomban mindkét ciklin gén egy kópiában van jelen. Eltérő volt azonban a hibridizációs csíkok mérete: a *CycIIIMs* egy alacsony molekulásúlyú DNS darabhoz hibridizált (kb. 1.8kb), míg a *CycSMs* egy nagy molekulásúlyúhoz (kb. 7kb). A *CycIIIMs*-sel való hibridizálás ezen kívül egy nagyon gyenge hibridizálási csíkot is eredményezett (nyíllal jelölve a 14. ábrán), ami arra utal, hogy ezzel a ciklinnel hasonlóságot mutató másik ciklin gén is megtalálható a *M. truncatula* genomban. A tetraploid *M. sativa* ssp *sativa* két variánsából izolált teljes DNS-hez való hibridizálás után a *CycIIIMs* próbát két-két, azonos méretű DNS darabhoz hibridizált. A *CycSMs*-t használva próbaként három-három azonos méretű hibridizálási csíkot érzékeltünk mindkét tetraploid variánsban. A hibridizálási jelet mutató DNS darabok mérete a *CycIIIMs* esetében kb. 1.9kb és 2.6kb volt, a *CycSMs* esetében pedig kb. 2.7kb, 3.0kb és 3.7kb. Ennek a hibridizálási mintázatnak a legvalószínűbb magyarázata, hogy mindkét gén több, mint egy kópiában van jelen a tetraploid fajok genomjában. Az a lehetőség sem zárható ki, hogy a tetraploid fajok esetében az exonokat elválasztó intronokban több *EcoRI* hasítóhely van. Ebben az esetben az adott ciklin genomi szekvencia az emésztés hatására feldarabolódik, és több hibridizálási csíkot



14. ábra. A *CycIIIMs* és *CycSMs* gének összehasonlítása Southern hibridizációval. 1. *Medicago truncatula*. 2. *M. sativa* ssp *sativa* RA3. 3. *M. sativa* ssp *sativa* Nagyszénás.

érzékelünk, mint ahány példányban a gén valójában megtalálható a genomban. A Southern hibridizáció eredménye alátámasztotta a szekvenciaelemzésből adódó feltételezést, miszerint két, egyértelműen különböző ciklinnel állunk szemben.

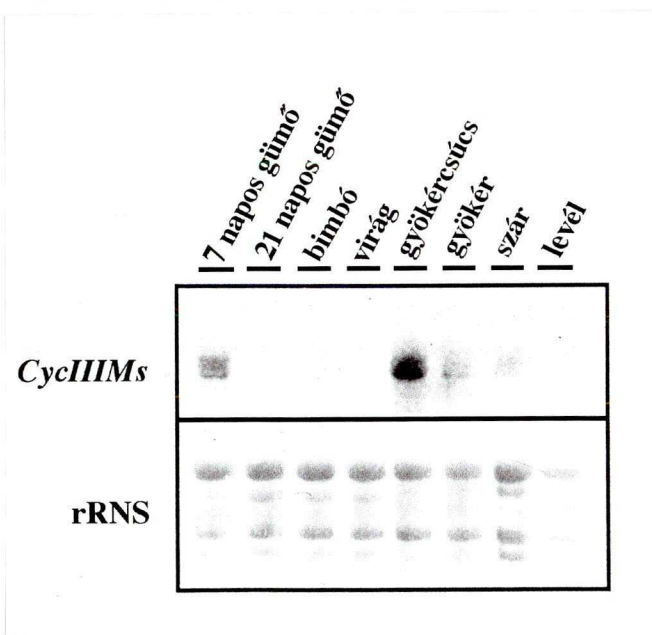
A *CyclIIMs* és *CycSMs* sejtciklusban betöltött szerepének meghatározására részlegesen szinkronizált lucerna sejt kultúrában vizsgáltuk a kifejeződésüket (15. ábra). A sejt kultúrát hidroxü-ureával (HU) kezeltük 36 órán keresztül, aminek következtében a sejtek túlnyomó része a korai S-fázisban állt meg a sejtosztódásban (Savouré és mtsai., 1995). A HU eltávolítása után a sejtek szinkronizáltan haladtak tovább az sejt ciklusban. Legtöbbjük a 10. óra tájékán érte el a G2 fázis maximumát, a 12-14. óra táján aktivan osztódott, majd a 22. óra körül belépett az új osztódási ciklus G1 fázisába. A HU kezelést követően különböző időpontokban mintát vettünk a kezelt sejtekből és a mintákból RNS-t izoláltunk.



15. ábra. A *CyclIIMs* és *CycSMs* gének kifejeződésének összehasonlítása Northern hibridizációval hidroxü-ureával részlegesen szinkronizált *Medicago* sejt kultúrában. A vízszintes tengelyen van feltüntetve a hidroxü-urea kezelés és a mintavétel között eltelt idő, az adott mintára vonatkozóan. A függőleges tengelyen a sejtek DNS tartalom szerinti látható, százalékban kifejezve. Csillaggal vannak jelölve azok az minták, ahol kísérleti hiba folytán kevesebb RNS került a hibridizációs membránra.

Mindkét ciklin gén kifejeződése sejtciklus függő-nek bizonyult, de egymástól eltérő mintát mutatott. A *CycIIIMs* gén kifejeződése a G2-M átmeneti szakaszban hirtelen növekedést mutatott, magasan maradt az aktív mitózis fázisában, majd a mitózis befejeződésével ismét lecsökkent. Ez a kifejeződési minta erősíti aszekvenciaelemzésből adódó következtetést, miszerint a *CycIIIMs* a G2-M fázis átmeneténél játszik szerepet és a mitotikus ciklinek családjába sorolható. A *CycSMs* kifejeződése a HU eltávolítása után rögtön kimutatható volt, és a sejtciklus S-fázisában, valamint a korai G2 fázisban magas maradt. Ezután kifejeződése a detével csökkent, de ezen az alacsonyabb szinten szinte minden fázisban megtalálható volt. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a *CycSMs* valószínűleg a sejtciklus S-fázisában, a DNS megkettőződése során játszik szerepet. A kifejeződési mintázat arra is utal, hogy a *CycSMs* nem tartozik a ciklikusan kifejeződő ciklinek közé, és aktivitása valószínűleg poszt-transzlacionálisan szabályozott.

A *CycIIIMs* kifejeződését vizsgáltuk a lucerna különböző szerveiben (16. ábra). A gén kifejeződése erős volt az olyan növényi szövetekben, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak aktívan osztódó sejteket, például korai (7 napos) gumókban és gyökércsúcsban. Jóval gyengébb volt a kifejeződése nem szinkronizált sejt kultúra sejtjeiben, és nem volt kimutatható levélben és kifejlett idős gumóban, ahol a merisztéma aktivitása lecsökken. Ez az eredmény a *CycIIIMs* sejtosztódáshoz kötött részvételét tükrözi.



16. ábra. A *CycIIIMs* gén kifejeződésének vizsgálata *Medicago* különböző szerveiben Northern hibridizációval.

5.4. Lucerna *msc27* gén jellemzése (Publikáció előkészületben).

5.4.1. Az *msc27* gén szekvenciaelemzése.

Az *msc27* gént 2,4-dichlorophenoxy-ecetsavval (2,4-D; szintetikus auxin) kezelt és hormonnal nem kezelt lucerna sejtkultúrából készített cDNS könyvtárak differenciál hibridizációja során izolálták (Györgyey János, 1996). A 2,4-D szintetikus auxin a *Medicago* sejtkultúrát embriók képzésére serkenti. Az *msc27* teljes hosszúságú cDNS-ének szekvenciája az 17. ábrán látható. A cDNS 695 nucleotidból áll és 20 ATG kodont tartalmaz. Az ATG kodonok a szekvenciában a következő pozíciókban találhatók: 47, 78, 120, 125, 179, 213, 225, 351, 449, 453, 456, 459, 489, 525, 586, 602, 633, 653, 656, 661 bázis. Növények esetében kimutatták, hogy a kódoló cDNS-ek 95%-a esetében fehérjék átírása az első ATG kodonnal kezdődik (Heidecker és Messing, 1986). Az *msc27* esetében az első ATG kodonnal kezdődik a leghosszabb átírási szakasz, amely egy 167 aminosavból álló fehérjét kódol. Ennek feltételezett molekulásúlya 23 kDa. Az *msc27* szekvenciájából adódó feltételezett fehérje nagy mennyiségben tartalmaz leucint (11,38%) és lizint (10,78%). A magas leucin tartalom ellenére nem sikerült leucin-zippzár motívumot kimutatni a szekvenciából. A feltételezett fehérje szekvencia tartalmaz egy lehetséges glikozilálási helyet (N-X-S, Hart és mtsai., 1979), amely arra utal, hogy a fehérje a szintézisét követően poszt-transzlacionális módosításon mehet keresztül.

Az *msc27* feltételezett aminosav szekvenciájához hasonló szekvenciák keresése során kiderült, hogy több növény és gerinces fajból, valamint élesztőből és metazoákból is izoláltak hasonló aminosav szekvenciát kódoló géneket. A növények közül a lucerna *Msc27* homológiát mutat egy borsó (*Pisum sativum*), egy burgonya (*Solanum tuberosum*), egy rizs (*Oryza sativa*) és egy *Fragaria*-ananász keresztezésével előállított növényből származó fehérjéjével, valamint egy lucernából (Páy és mtsai., 1992) és egy *Arabidopsis thaliana*-ból izolált részleges fehérje szekvenciával. Az gerincesek közül egér (*Mus musculus*, Chitpatima és mtsai., 1988), humán (*Homo sapiens*, Böhm és mtsai., 1989), nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) és tyúk (*Gallus gallus*) fajokból származó hasonló szekvencia áll rendelkezésre. Két élesztő faj, a *Saccharomices cerevisiae* és a *Scizosaccharomices pombe* is tartalmaz a genomjában az *msc27*-hez hasonló szekvenciát. Az egér és humán *Msc27* homológ szekvenciákról feltételezik, hogy transzlacionálisan szabályozott tumor proteinek. Az lucerna részleges aminosav szekvencia 100%-ban azonos az *msc27* aminosav szekvenciával, azonban a teljes hosszúságú *Msc27* aminosav szekvencia a korábban közölt részleges szekvenciához képest 11 további aminosavat tartalmaz a feltételezett fehérje N-terminális végén. A különböző fajokból izolált *Msc27*-hez homológ szekvenciák egymáshoz való hasonlóságát a 18. ábra mutatja be.

M L V Y Q CCCGCGACTCACTTGCACCAGAGCGTCCAGAGCAGTACTCTTCATCATGTTGGTTTACCA	60
D L L T G D E L L S D S Y P Y K E I E N GGATCTCCTTACCGGTGATGAGCTTCTGTGAGACTCTTACCCATACAAGGAAATTGAGAA	120
G M L W E V E G K W V T K G V V E V D I TGGAAATGTTGTGGGAGGTTGAGGGAAAGTGGGTTACTAAGGGAGTTGTTGAAGTAGACAT	180
G A N A S A E G G E D E G V D D T A V K TGGTGCTAACGCTTCTGCTGAAGGTGGGAAGATGAGGGTGTGATGACACAGCTGTAA	240
V V D I V D V F R L Q E Q P A F D K K Q GTTGTGCGACATTGTTGACGTATTCAGACTTCAGGAACAACTGCTTTTGACAAGAAGCA	300
F L G F V K R Y I K L L T P K L D A E K GTTTCTTGGCTTTGTTAAGAGGTATATCAAGTTGCTGACACCCAACTAGATGCAGAGAA	360
Q E L F K K H I E G A T K Y L L C K L K ACAAGAGCTGTTTAAAGAAGCACATTGAGGGAGCAACCAAATACTTGCTCTGCAAGCTCAA	420
D L Q F F V G E S M H D D G S L V F A Y GGACCTTCAATTCTTTGTTGGTGAGAGCATGCATGATGATGGTAGCTTGGTCTTCGCTA	480
Y K D G A A D P T F L Y F A Y A L K E I CTACAAGGATGGTGCTGCTGATCCAACATTTCTCTACTTTGCTTATGCTTTGAAGGAAAT	540
K C * CAAGTGTTAAGTGTGTAAGTGTGCTGCTGATCCAACATTTCTCTACTTTGCTTATGCTTTGAAGGAAAT	600
AATGTGTTCTAAGTTACTCGAGAGTTGAGACTATGATTTGGTGTGTTTGTATAATGATGTG ATGATTTGAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	660
	695

17. ábra. Az *msc27* cDNS nukleotid szekvenciája, valamint az ebből adódó aminosavszekvencia. Kék nyilak jelölik a PCR reakcióban használt oligonukleotidok helyét és irányultságát. A Southern és Northern hibridizációban próbaként használt DNS szakaszt piros aláhúzás jelöli.

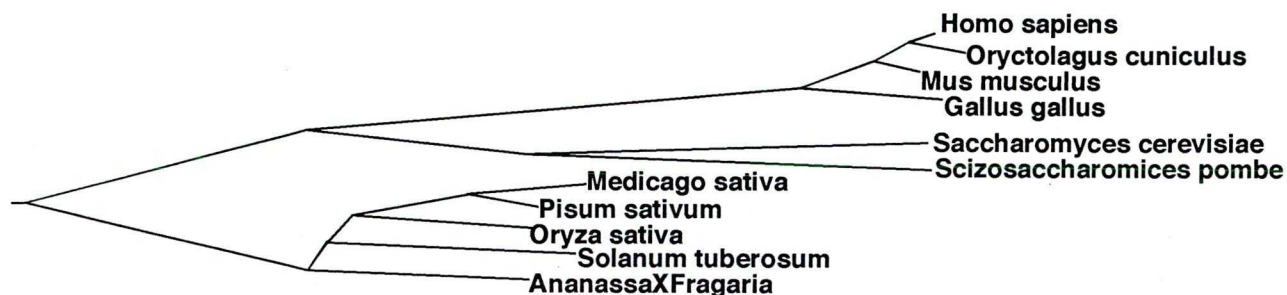
Az ismert aminosav szekvenciák összehasonlítása után szembetűnő, hogy a különböző fajokból származó fehérje szekvenciák igen nagy hasonlóságot mutatnak. A növényekből származó fehérjék aminosavai átlagosan 66%-ban megegyeznek egymással, míg a gerincesekből származó fehérjénél ez az arány 86%. Az aminosav szekvenciák N-terminális részén található egy erősen konzervált szakasz, amelynek szekvenciája $IG^A/GN^P/ASAE$. Ehhez hasonló szekvencia kimutatható volt a bindin fehérjében (18. ábra), amely a tengerisün hímivarsejtjeiben termelődik, és a fajspecifikus megtermékenyítésért felelős (Metz and Palumbi, 1996).



18. ábra. A különböző fajokból származó, *msc27*-hez hasonló aminosavszekvenciák összehasonlítása. A megegyező aminosavak szürke négyzetben láthatók. Kékkel vannak jelölve a hisztamin-felszabadító faktor azon aminosavai, amelyek az *msc27*-tel megegyezők. Pirossal vannak jelölve a bindin fehérje azon aminosavai, amelyek az *msc27*-tel megegyezők.

A különböző fajokból származó Msc27-hez hasonló fehérjék egymáshoz való hasonlósága alapján szerkesztett genetikai fa az 19. ábrán látható. A genetikai fából az a következtetés vonható le, hogy az evolúció során elsőként a növényi gének fejlődése válhatott külön a többi eukarióta gén fejlődésétől, majd ezt követhette az élesztő gének és az állati gének

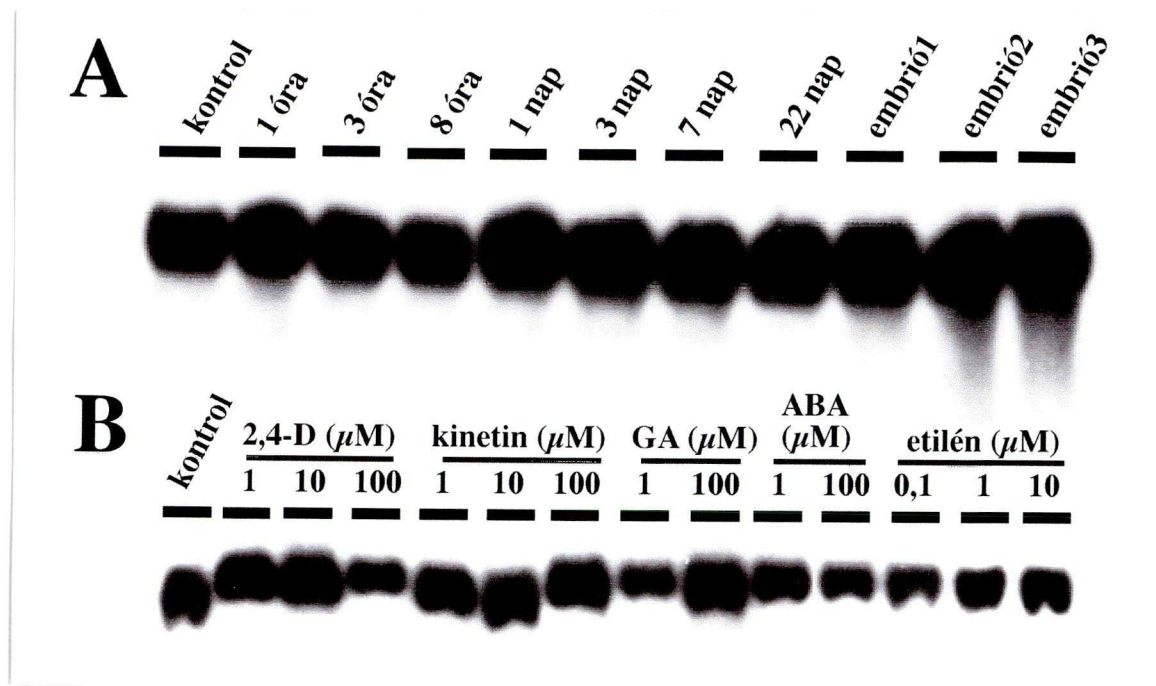
szétválása. A növényi gének közül a két pillangós növényből (lucerna és borsó) származó gén mutatja a legközelebbi rokonságot. A gerinceseknél az élesztőtől való elválás után a szárnyasok és az emlősök génjeinek külön úton való fejlődése figyelhető meg. A további szekvencia elemzési próbálkozások, amelyek arra irányultak, hogy ismert szerepű fehérjeszakaszokat azonosítsunk az Msc27 feltételezett aminosavszekvenciáján belül, nem jártak sikerrel.



19. ábra. Az *msc27*-hez hasonló gének családfája.

5.4.2. A lucerna *msc27* génjének vizsgálata Southern hibridizációval.

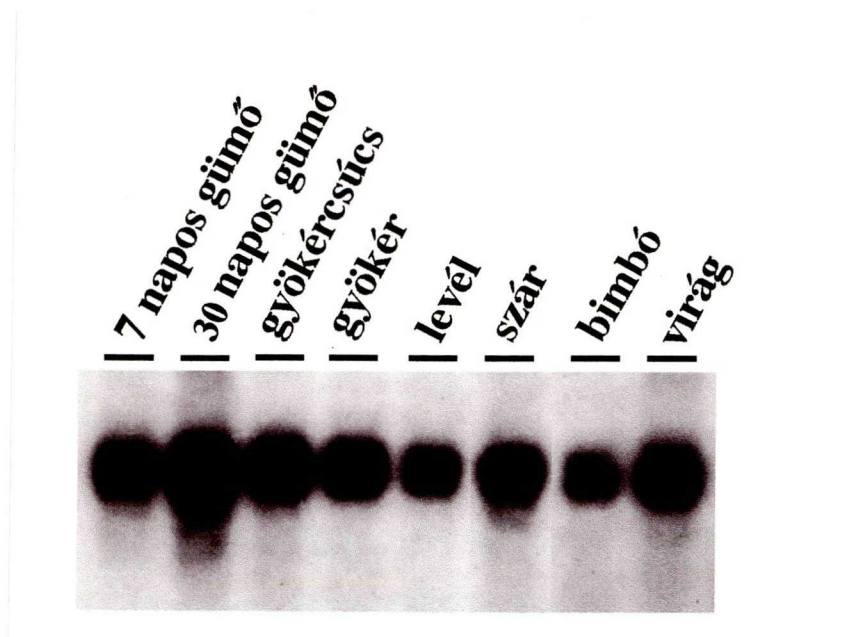
Az *msc27* gén kópiaszámát különböző növényfajokban Southern hibridizációval vizsgáltuk. Az eltérő növényfajokból először DNS-t izoláltunk, majd azt *EcoRI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel emésztettük meg. Az emésztési termékeket agaróz gélen választottuk el egymástól, és a gélről hibridizációs membránt készítettük. Hibridizációs próbaként az *msc27* gén egy PCR reakcióban amplifikált szakaszát használtuk, amit ^{32}P -es izotóppal jelöltünk (lásd 17. ábra). A hibridizáció elvégzése után a *Medicago sativa* ssp *sativa* A2 és RA3 tetraploid lucernák genomi DNS-ével három-három hibridizációs csíkot érzékelünk: egy erőset és két gyengébbet (20. ábra). A hibridizáló DNS darabok mérete megegyezett a két lucerna variánsban. Ennek a hibridizálási mintázatnak a legvalószínűbb magyarázata, hogy mindkét tetraploid lucerna egy *msc27* gént hordoz, azonban több, kissé eltérő homológ szekvencia is megtalálható a genomjukban. Az *msc27* jelölt szakasza nem adott hibridizációt a burgonya és kukorica genomi DNS-éhez.



21. ábra. Az *msc27* gén kifejeződésének vizsgálata különböző növényi hormonokkal kezelt *Medicago sativa* ssp *sativa* RA3 sejtszuszpenzióban. **A**, Egyszeri, rövid ideig tartó 2,4-D kezelés rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata az *msc27* kifejeződésére lucerna sejtszuszpenzióban. **B**, Különböző koncentrációjú 2,4-D, kinetin, giberrelinsav, abszcizinsav és etilén kezelések hatása az *msc27* kifejeződésére.

Ezután a növényi hormonok eltérő csoportjaiba tartozó hormonokkal kezeltük a sejtszuszpenziót. A 2,4-D szintetikus auxint, a citokininek csoportjába tartozó kinetint, giberrelin savat (GA), abszcizin savat (ABA) és etilént adtunk a tápoldatba, eltérő koncentrációban. Az tapasztaltuk, hogy hormon kezeléseknek nem volt nagyobb hatása az *msc27* kifejeződésére (21B. ábra). Az *msc27* gén kifejeződése a kezdeti, a kezeletlen szuszpenzióban magas volt, és egyik növényi hormon sem befolyásolta jelentős mértékben az *msc27* kifejeződését. A kisebb eltérések feltehetően a felhasznált RNS kissé eltérő mennyiségéből adódnak.

Ezután a lucerna különböző szerveiben vizsgáltuk az *msc27* kifejeződését. Kimutattuk, hogy a gén kifejeződése lucerna különböző szerveiben is magas volt, de a különböző szervekben való kifejeződése csak kisebb eltéréseket mutatott (22. ábra). Az *msc27* kifejeződése a legerősebb volt az idős (30 napos) gumókban, leggyengébb pedig a bimbóban és a szárban. A különbség az *msc27* hibridizációjának erősségében ezen szervek között kb. két-háromszoros, vagyis az idős gumóban a génnek kb. kétszer több mRNS-e található, mint bimbóban, illetve szárban. A gyökérgumókban és gyökérben a kifejeződése közel azonos volt, ami azt sugallja, hogy a gén kifejeződését a Nod faktorok nem befolyásolja, és a tumor proteinekkel való rokonsága ellenére az *msc27* kifejeződése nem erősebb az aktívan osztódó szövetekben.



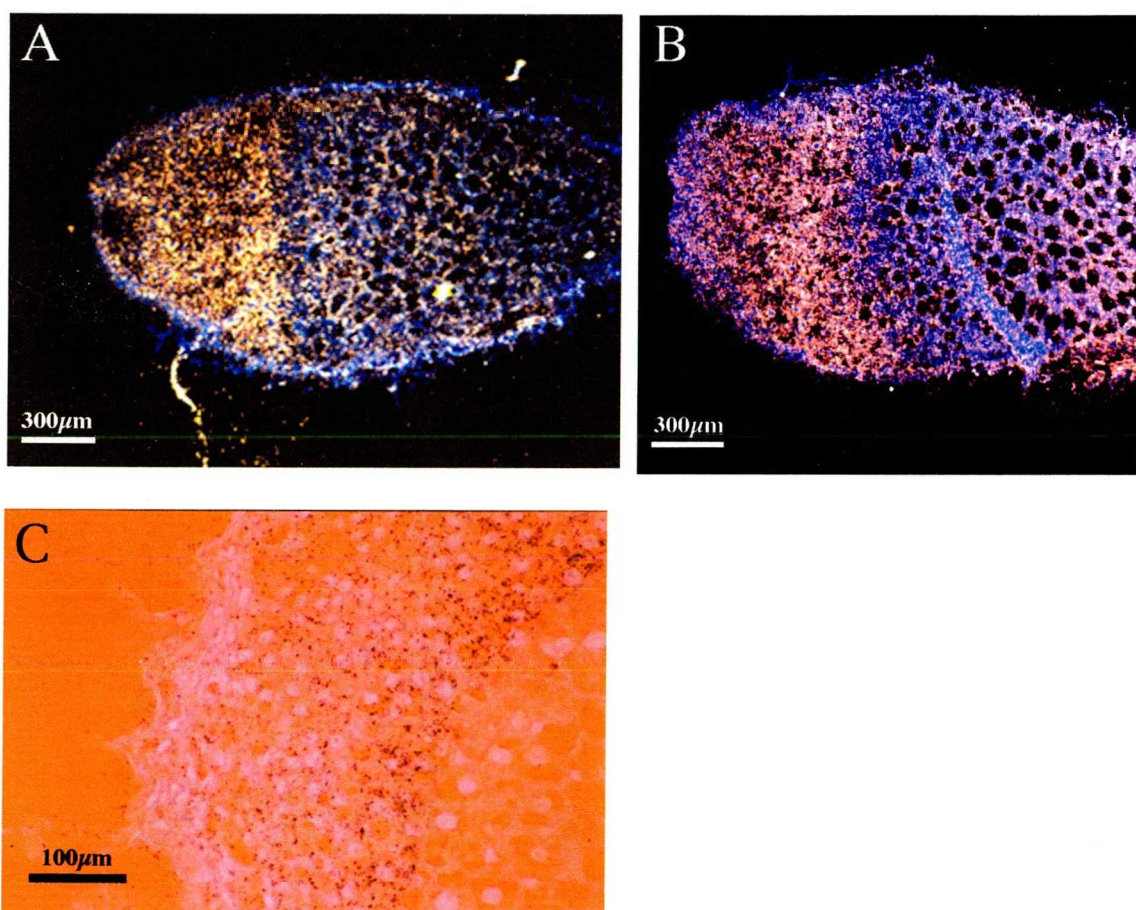
22. ábra. Az *msc27* gén kifejeződésének változása *Medicago sativa* ssp *sativa* Sitel növény különböző szerveiben.

5.4.4. Az *msc27* gén térbeli kifejeződésének vizsgálata lucerna gyökérgümőben.

Mint arra a bevezetőben rámutattunk, az *in situ* hibridizáció képes a különböző gének kifejeződését kimutatni a mRNS-ük képződésének helyén. Ezáltal sokkal pontosabb és érzékenyebb módszer a gének kifejeződésbeli különbségeinek kimutatására, mint a Northern hibridizáció. Az *msc27* térbeli kifejeződésében való esetleges eltéréseket lucerna gyökérgümőkben *in situ* hibridizációs kísérlet segítségével vizsgáltuk, remélve, hogy így közelebb juthatunk a gén szerepének megismeréséhez. A lucernából izolált, teljes hosszúságú cDNS-t pBluescript KS⁺ vektorba klónoztuk, *Pst*I helyre, a T3 promóter felől kezdődően. Az *in situ* hibridizációt a 5.1. fejezetben ismertettek szerint végeztük el. A gén kifejeződését különböző korú (7, 14 és 21 napos), *Medicago sativa* ssp. *sativa* cv Sitel növényen képződött gümőkben vizsgáltuk (23. ábra).

Azt tapasztaltuk, hogy a gümő korától függetlenül az *msc27* az osztódó szövet mögött, az infekciós zónában fejeződik ki legerősebben. A gén kifejeződésének térbeli mintája hasonlóságot mutatott az *Msenod12* gén kifejeződésével. Az eltérés a különböző korú gümők között csak a hibridizáló zóna arányában volt a többi gümőzóna arányához viszonyítva. Bár az infekciós zóna mérete azonos, aránya a többi zónához viszonyítva nagyobb a fiatal gümőben, mint idős gümőben. Ez az eredmény nem támasztja alá a Northern hibridizációs kísérlet eredményeit, amelyben az *msc27* kifejeződése kissé magasabb volt az idős gümőkben. Mivel az *in situ* hibridizációs tech-

nika sokkal pontosabb képet ad egy gén kifejeződéséről, mint a Northern hibridizációs technika, így ez az eredmény arra utal, hogy a Northern hibridizációval tapasztalt gyenge kifejeződésbeli különbség az idős és fiatal gümők között a felhasznált RNS mennyiségéből eredő kísérleti hiba volt. Az *in situ* hibridizáció eredménye alapján megállapítottuk, hogy a lucerna gyökérgümőkben jelentős eltérések mutathatók ki a mRNS mennyiségében az egyes szimbiotikus zónák között, vagyis az *msc27* a mRNS átíródás szintjén szabályozódik lucerna gyökérgümőkben. Az *in situ* hibridizációs kísérletek eredménye megerősíti a technika hasznosságát és jelentőségét a gének kifejeződésének vizsgálatában.



23. ábra. Az *msc27* gén térbeli kifejeződése különböző korú *Medicago sativa* ssp *sativa* Sittel gyökérgümőkben. **A.** 14 napos gyökérgümő, sötét mezőjű mikroszkóp. **B.** 21 napos gümő, sötét mezőjű mikroszkóp. **C.** 21 napos gümő csúcsi része nagyításban, fénymikroszkóp.

6. Megvitatás.

A doktori dolgozatomban ismertetett munkám során négy különböző lucerna (*Medicago*) gén jellemzésében vettem részt, amelyek a szimbiotikus gümőképződés során játszanak, illetve játszhatnak szerepet. Ezek közül az *Msenod12* egy korai nodulin gén, amely a Nod faktorok hatására indukálódik a *Medicago* és a *Rhizobium* között kialakuló szimbiózis korai szakaszában. A dolgozatban jellemzett *CycIIMs* és a *CycSMs* ciklin gének a lucerna sejtosztódási ciklusában játszanak szerepet. A negyedik gén, az *msc27*, egy állandóan magas szinten kifejeződő gén, amely a más *Medicago* gének kifejeződésének tanulmányozásához szolgálhat belső kontrollként. Ezek mellett részt vettem az *in situ* hibridizációs technika kísérleti körülményeinek beállításában, és a technikát használva különböző *Medicago* gének térbeli kifejeződését vizsgáltam lucerna gyökérgümőkben.

Elsőként célul tűztük ki az *in situ* hibridizációs technika körülményeinek beállítását, amely technika igen sok új információval gazdagíthatja ismereteinket a különböző lucerna gének kifejeződésének térbeli eloszlásáról. Ezek az adatok közelebb vihetnek minket az ismeretlen funkciójú gének szerepének megismeréséhez. Az 5.1., 5.2. és 5.4. fejezetben bemutatott adatok alapján kijelenthetjük, hogy az *in situ* hibridizáció beállítására irányuló kísérletek sikerrel jártak. A fixálási és beágyazási lépések sikerességét bizonyítja, hogy a vizsgált gümők megőrizték jellemző szerkezetüket és sikerült bennük kimutatni egymástól egészen eltérő gének kifejeződését (késői nodulin, korai nodulin, állandó kifejeződésű gén; 6., 7. és 23. ábrák). Az *in situ* hibridizációs technika körülményeinek beállítása során egy késői nodulinként ismert génről, a leghemoglobinról kimutattuk, hogy a különböző korú gyökérgümőkben a gümő alapi részében fejeződik ki, ahol aktív nitrogénkötés folyik. A lucerna leghemoglobin génjének térbeli kifejeződése a gyökérgümőben a borsó leghemoglobin génjének kifejeződéséhez hasonló mintázatot mutat (Scheres és mtsai., 1990b). Ez az eredmény összhangban van hagyományos szerepével: a leghemoglobin az oxigén háztartás fenntartásában játszik szerepet a nitrogénkötés folyamán.

A *Medicago* gének közül elsőként az *enod12* korai nodulin gént vizsgáltuk. *In situ* hibridizációs kísérletek kimutatták, hogy a gén a mind a fiatal, mind az idős gyökérgümőben az infekciós zónában fejeződik ki, közvetlenül az osztódószövet mögött. Borsó és diploid *M. truncatula* fajokon képződött gyökérgümőkben az *enod12* térbeli kifejeződése a lucerna gümőben tapasztalt hibridizációs mintázathoz hasonló volt (Scheres és mtsai., 1990a; Pichon és mtsai., 1992; Vijn és mtsai., 1995b). Mivel az *enod12* gén nem nyilvánul meg spontán képződött gümőkben (Bauer és mtsai., 1994), így kifejeződése nem a gümőszerkezet kialakításához kötött. Az a tény, hogy a gén hasonlóságot mutat a sejttal felépítésében résztvevő hidroxiprolinban gazdag fehérjékhez, valamint az *Msenod12A* kifejeződése szoros összefüggést mutat a baktérium invázióval, arra a feltételezésre vezetett minket, hogy az *enod12* az invázió során képződő új sejtfalak, például az infekciós fonál, felépítésében játszik szerepet. Az *Msenod12A* és *B* gén kifejeződésének tanul-

mányozására irányuló kísérletek kimutatták, hogy a két gén kifejeződése eltérően szabályozódik a gümő kialakulása során. Az *Msenod12A* kifejeződése szigorúan a baktérium inváziójához kötött, míg az *Msenod12B* kifejeződését a Nod faktorok is képesek beindítani (Bauer és mtsai., 1994). Ennek alapján valószínű, hogy a két *Msenod12* gén térbeli kifejeződése a lucerna gyökérgümőkben is eltérő, azonban ez a gének nagy hasonlósága miatt nem mutatható ki *in situ* hibridizációval. A gyenge hibridizációs jel, amit a gümő kéregsejtjeiben tapasztaltunk valószínűleg az *enod12* próba kereszt-hibridizálásából ered egyéb, prolinban gazdag szekvenciákhoz. Egy gyenge kereszt-hibridizálási jel érzékelhető volt az *Msenod12* gének kifejeződésének Northern hibridizációval való jellemzése során is (Allison és mtsai., 1993).

A korai nodulin gének egyre növekvő száma és intenzív tanulmányozásuk ellenére valódi szerepükre a gümőképződés folyamán csak következtetések vannak, amelyek alapja főleg az ismert funkciójú fehérjékhez való szekvencia hasonlóság (Franssen és mtsai., 1992; Munoz és mtsai., 1996; Coba de la Pena és mtsai., 1997; Goormachtig és mtsai., 1998). A valamely *enod* génben mutáns növények jellemzése azért jelentős, mert segítségükkel vizsgálható a nodulinok szerepe a gyökérgümő képződésben és a nitrogénkötés során (Penmetsa és Cook, 1997). A dolgozatban megkezdett munka kezdetéig azonban nem számoltak be olyan növényről, amelyben valamely *enod* gén hibás lett volna. A dolgozat keretében bemutatott *enod12* genotípusú *Medicago* növények vizsgálata az első alkalom, amikor egy nodulin génben hiányos növény jellemzésére sor került.

Két diploid *Medicago* faj (Mqk93 és Mcw2) keresztezésével előállított utódpopulációban vizsgáltuk az *enod12* jelenlétét. Ezek a szülőként használt fajok heterozigóták, így keresztezésükkel genetikailag nagyon változatos utódpopuláció hozható létre, amely a különböző *Medicago* gének vizsgálata szempontjából nagy jelentőségű. Ezen túlmenően a diploid fajokban egyszerűbb a gének öröklődésének nyomonkövetése, mint tetraploid fajokban. A Mcw2-ről kimutattuk, hogy két *enod12* gént hordoz, a *M.s. sativa* cv Nagyszénási fajtához hasonlóan (Allison és mtsai., 1993). Southern hibridizációval egy harmadik, gyengén hibridizáló jelet is érzékeltünk az Mcw2 genomjában az *enod12*-t használva próbaként. Mivel PCR kísérletekben nem sikerült kimutatni ezt az esetleges harmadik *enod12* gént, így feltételezzük, hogy ez a hibridizációs jel egy, az *enod12*-höz hasonló hidroxiprolinban gazdag szekvenciához való kereszt-hibridizálás eredménye. A Mqk93 egyetlen *enod12* gént hordoz, a *M. truncatula* cv Jemalong fajtához hasonlóan (Pichon és mtsai., 1992). Az eltérő számú *enod12* gén jelenléte a különböző fajtákban nem korlátozódik csak a *Medicago* nemzetségre, a különböző borsó fajtákra is jellemző (Govers és mtsai., 1991; Kozik és mtsai., 1992). A diploid Mqk93 és Mcw2 keresztezéséből származó F1/1 egyed csak az Mqk93 egyetlen *enod12* génjét örökölte. Az F1/1 egyed önbeporzásával előállított utódpopulációban megjelentek olyan növények, amelyek genomjukban nem tartalmazták az *enod12* korai nodulin gént. Az *enod12* öröklődésének nyomon követése a szülői és az utódpopulációkban feltárta, hogy az apai egyedként használt növény (Mcw2) heterozigóta az *enod12* génre nézve; az egyik kromoszómapárján két *enod12* gént hordoz, amelyek szorosan

kapcsoltan öröklődnek, míg a másik kromoszómapárjáról hiányzik az *enod12* gén (null allél). Az *enod12* hiányos F2 egyedek csak az apai ágról örökölt null allélokat hordozták. Ezt a tényt alátámasztotta az *enod12* gén nyomkövetése a Mcw2 önbeporzott populációjában, ahol az F1 nemzedékben szintén megjelentek az *enod12* hiányos növények (Csanádi és mtsai., 1994). Az *enod12* gént a *Medicago* 3. kromoszómájának végére térképezték (Kiss és mtsai., 1993). Ennek ismeretében feltételeztük, hogy a kromoszóma ezen darabjának delécioja következtében alakulhatott ki a null allél. Az *enod12* gén elvesztésének itt bemutatott példája valószínűleg nem egyedi eset. Feltételezzük, hogy a csak egyetlen *enod12* gént hordozó növény fajok is (*M. sativa ssp quasifalcata*, *M. truncatula*) a két gént tartalmazó fajokból (*M. sativa ssp coerulea*, *M. sativa ssp sativa*) alakultak ki delécioval. A *M. sativa sativa* cv Iroquois fajtában pedig nem tudták kimutatni *enod12* jelenlétét (Löbner és Hirsch, 1993), ami arra enged következtetni, hogy ez a fajta az evolúció során elvesztette ezt a nodulin gént. A null allél az általunk vizsgált növényekben a Mendeli recesszív génnek szabályainak megfelelően, stabilan öröklődött, és az *enod12⁻* növényekből többszöri vegetatív szaporítás után sem volt kimutatható az *enod12* jelenléte. Ez azt bizonyítja, hogy az *enod12* hiánya a növényekben nem mozaikos jellegű, hanem az egész növényre kiterjedő genotípus.

A továbbiakban figyelemmel kísértük a szülői és utódpopuláció növényein a gümőképződést és azok életképességét. Azt figyeltük meg, hogy az *enod12* gént nem hordozó növényeken a gümőképződés időbeli lefolyása nem tér el a többi növényen tapasztaltaktól, és az *enod12* növényeken képződött gümők külsejükben és belső szerkezetükben megegyeznek az *enod12* gént hordozó növényeken képződött gümőkkel. A különböző növényeken képződött gümőkben az eltérések az *enod12* gén kifejeződésében szinte minden esetben tükrözték a növények genomjában kimutatható különbségeket. Kivétel képezett az apai Mcw2 növény, amelyen képződött gümőkben csak az *enod12A* gén kifejeződését sikerült kimutatni. Ennek magyarázata, hogy az *enod12* gének kifejeződését idős gümőkben vizsgáltuk. Az idősebb gümőkben az *enod12B* gén kifejeződése erősen lecsökken, és csak az *enod12A* jelenléte mutatható ki (Bauer és mtsai., 1994). Az *enod12⁻* növényeken képződött gümőkben nem volt kimutatható az *enod12* kifejeződése. Ennek ellenére a mutáns növényeken képződött gümőkben aktív nitrogénkötést sikerült kimutatnunk. Az eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy az általunk használt diploid fajok esetében az *enod12* hiánya semmilyen módon nem befolyásolta a növények életképességét, a gyökérgümő kialakulását, illetve a nitrogénkötést. Ennek többféle magyarázata lehet. Legvalószínűbb, (i) hogy az *enod12* szerepét ezekben a mutáns növényekben egy másik fehérje vette át. Az *enod12* a hidroxiprolinban gazdag fehérjék családjához tartozik, amelyekről feltételezik, hogy a sejtfalak felépítésében játszanak szerepet (Showalter, 1993). Az *enod12*-n kívül több korai nodulint is azonosítottak, amelyek szintén a hidroxiprolinban gazdag fehérjék családjához tartoznak (Munoz és mtsai., 1996). Elképzelhető, hogy ezek közül valamelyik képes átvenni az *enod12* szerepét az *enod12* hiányos növényekben. Ezt a feltevést erősíti, hogy a *M.*

sativa ssp *sativa* cv Iroquois fajtából, amely nem hordozza az *enod12* gént, kimutatták egy, az *enod12*-höz nagyon hasonló gén jelenlétét. Ez a gén, az *enod10* szintén prolinban gazdag fehérje, és térbeli kifejeződése a lucerna gyökérgümőkben is hasonló az *enod12*-éhez (Löbner és Hirsch, 1993). Egy másik lehetséges magyarázat (ii), hogy az *enod12* gén csak bizonyos *Medicago* fajtáknál elengedhetetlen a gümőképződéshez, illetve a nirtogénkötéshez, míg az általunk használt diploid fajok esetében szerepe nem jelentős. Az sem zárható ki (iii), hogy az *enod12*-nek csak bizonyos, a vizsgált *R. meliloti* törzstől eltérő mikroszimbiontákkal kialakuló szimbiózis során van szerepe, illetve (iiii) bizonyos eltérő, általunk nem vizsgált életkörülmények között kialakuló szimbiózis esetén fontos a kifejeződése *Medicago*-ban. Általánosságban leszögezhető, hogy a nodulinokban hiányos és mutáns növények vizsgálata fontos a nodulin gének szerepének, valamint a gümőképződés folyamatának alaposabb megismeréséhez. Ilyen nodulin génben mutáns növények előállításának egy lehetséges és hatékony módja lehet az itt bemutatott, heterozigóta diploid fajták keresztezése.

A szimbiózis kezdetén a korai nodulin gének kifejeződésének beindításával párhuzamosan zajlik a gümőprimordium kialakulása, amely a sejtosztódási ciklus újraindítását igényli a gyökér differenciálódott kéregsejtjeiben. A sejtosztódási beindításában éppen úgy, mint a sejtciklus különböző fázisaiban fontos szerepet játszanak a ciklin-függő kinázok, valamint szabályozó partnereik, a ciklinek (Pines, 1995; Hirt, 1996). A *Medicago* sejtosztódási ciklusának különböző fázisaiban, az eukariótákra jellemzően, több ciklin gén is szerepet játszik. Ezek közül ebben a dolgozatban kettőt jellemeztünk és hasonlítottunk össze. A *Cycl/IMs* az első teljes hosszúságú ciklin gén volt, amelyet *Medicago*-ból azonosítottak. A gén a szekvenciája alapján az állati A- és B-típusú ciklinekhez mutatott hasonlóságot (Hata és mtsai., 1991; Renaudin és mtsai., 1994). A másik vizsgált ciklin génből (*CycSMs*) csak egy részleges szekvencia állt rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz, amely ciklin box egy részének felel meg. Az állati mitotikus ciklineknek ez a része a legerősebben konzerválódott az azonos csoportba tartozó ciklinek között, mivel a ciklin box felelős a megfelelő CDK partnerrel való kapcsolódásért (Lee és Harlow, 1993; Zheng és Ruderman, 1993). Az általunk vizsgált két ciklin esetén különbözött a ciklin box szekvenciában, ezért feltételeztük, hogy a két ciklin eltérő ciklin csoportokhoz tartozik. Ezt megerősítette a Southern hibridizáció eredménye, amelyben a *Cycl/IMs* és *CycSMs* eltérő méretű DNS darabokhoz hibridizált a különböző *Medicago* fajtákban. Ezen túlmenően a két ciklin gén különböző helyekre térképeződik a *Medicago* kromoszómán (Savouré és mtsai., 1995; Kaló P. és Kevei F., személyes közlés). Az eltérő ciklin box szekvencia azt is sugallja, hogy a két ciklin valószínűleg eltérő CDK-hoz kapcsolódva, a sejtciklus eltérő fázisaiban fejti ki hatását.

A továbbiakban a *Cycl/IMs* és *CycSMs* gének kifejeződését hasonlítottuk össze a hidroxü-ureával részlegesen szinkronizált lucerna sejt kultúrában. *Cycl/IMs* kifejeződése a G2-M fázisok közötti átmeneti szakaszban volt magas, majd a mitózis befejeződése után a megfelelő mRNS mennyisége gyorsan lecsökkent. Ezen adatok alapján, valamint az állati A- és B-típusú ciklinekkel való hasonlósága alapján megállapítottuk, hogy a *Cycl/IMs* a mitotikus ciklinek közé

sorolható. A sejtciklustól függő szerepét megerősítette kifejeződésének mintázata lucerna különböző szerveiben. Az utóbbi években nagy számban izolált növényi ciklinek lehetővé tették a ciklinek újra osztályozását. Ennek során a nagyobb ciklin csoportokon belül alosztályokat különítették el. Ez lehetővé tette a különböző növényi ciklinek közötti rokonság pontosabb nyomonkövetését, ami segítségre lehet a szerepük meghatározásában a sejtciklus során. Ezen csoportosítás alapján az itt bemutatott *CycI/II/III* a mitotikus ciklinek B2 alosztályába sorolható (Renaudin és mtsai., 1996).

A *CycSMs* a *Medicago* sejtciklus korai S-fázisában, közvetlenül a hidroxü-urea eltávolítása után fejeződött ki a legerősebben, majd a késői G2-M fázisban a kifejeződése lecsökkent, de ezen az alacsonyabb szinten szinte minden fázisban kimutatható volt. Ez az eredmény arra utal, hogy a *CycSMs* az S-fázisban, a DNS megkettőződése során játszik szerepet, és valószínűleg az A-típusú ciklinek közé sorolható. Az *CycSMs* alacsony szintű kifejeződése a sejtciklus egyéb, az S-fázistól eltérő szakaszaiban hasonlóságot mutat az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) *cln3* génjének kifejeződésével (Tyers és mtsai., 1993). Ennek alapján feltételezhető, hogy a *CycSMs* más, esetleg a később kifejeződő mitotikus ciklinek pozitív szabályozója. Lehetséges, hogy ez a ciklin nem bomlik le az S-fázis végén, csak poszt-transzlációs folyamatokban inaktiválódik, és inaktív állapotban marad a következő S-fázisig. Végül az a lehetőség sem zárható ki, hogy a *CycSMs* alacsony kifejeződése a sejtciklus össze fázisában esetleg a hidroxü-urea kezelés kisebb határfokából adódó kísérleti hiba.

A *CycSMs* vizsgálata volt az első alkalom, hogy lucerna növényből S-fázisos ciklin került jellemzésre. Azóta izoláltak *Medicago*-ból egy teljes hosszúságú S-fázisban kifejeződő ciklin gént is (*cycMs3*, Meskiene és mtsai., 1995), amelynek kifejeződése a *CycSMs*-éhez nagyon hasonló. A *cycMs3* gén kifejeződése is erős közvetlenül a hidroxü-ureával történő kezelés után, a korai S-fázisban, és viszonylag magas marad a sejtciklus többi fázisában is. A *CycSMs* rendelkezésre álló darabja 86%-os hasonlóságot mutat a *cycMs3* szekvenciájához. Ezek alapján feltételezzük, hogy a *cycMs3* és *CycSMs* azonos géncsalád, a növényi A2 típusú ciklinek két különböző tagja (Renaudin és mtsai., 1996). Ennek a géncsaládnak valószínűleg további tagjai is léteznek *Medicago*-ban, mivel RACE-PCR módszerrel több, a *CycSMs*-hez szekvenciájában hasonló ciklint is sikerült azonosítani (Ruscinova és mtsai., 1995). A *cycMs3*-ról kimutatták, hogy valószínűleg a már differenciálódott sejteknek a sejtciklusba való újra belépése során játszik szerepet (Meskiene és mtsai., 1995). Mint ilyen gén, a tanulmányozása jelentős információval szolgálhat annak megismeréséhez, hogy a differenciálódott növényi sejtek milyen hatásokra lépnek be újra a sejtciklusba, valamint ez a folyamat milyen úton szabályozódik. A *cycMs3* és a *CycSMs* egyik lehetséges és lényeges szerepe például a gyökér differenciálódott kéregsejtjeinek Nod faktorok hatására történő osztódásra való reaktiválásában lehet lucernában.

A különböző, sokszor ismeretlen funkciójú gének kifejeződésének vizsgálatakor, illetve valamely génben mutáns növények jellemzésekor hasznos, ha a kísérleteket elvégzésekor egy kontrol gén is rendelkezésre áll. Ennek segítségével a kísérleti körülményekből adódó hibák ki-

mutathatók, illetve lecsökkenthetők. Egy gén kontrol génként való alkalmazásának feltétele, hogy az adott kísérleti körülmények között kifejeződése viszonylag állandó legyen az összes vizsgált mintában, valamint fontos, hogy olyan magas szinten fejeződjön ki, hogy kimutatása ne okozzon gondot. A dolgozat harmadik részében egy esetleges kontrol gént, a lucerna *msc27* génjét jellemeztük. A szekveneciaelemzési adatok alapján megállapítottuk, hogy gén egy olyan géncsaládhoz tartozik, amelynek tagjai erős homológiát mutatnak egymással. Mivel igen eltérő fajokból izolálták ezeket a géneket, ez a nagy hasonlóság azzal magyarázható, hogy feltehetően olyan életfontosságú fehérjék, amelyek valamilyen, a létezéshez elengedhetetlen alapfunkció során játszanak szerepet, ezért az evolúciós hatás csak kevésbé érintette őket. Újabban az egér és humán fajokból származó fehérjéről kimutatták, hogy homológiát mutatnak egy hisztamin-felszabadító faktorhoz, és maguk is képesek hisztamin felszabadítására (MacDonald és mtsai., 1995). A hisztamin felszabadítás az allergiás reakciók egy késői lépése, az allergénnel való kezelést követő 2-4 órán belül tapasztalható. A hisztamin felszabadítás történhet IgE-függő és IgE-független úton (MacDonald, 1996). Az *msc27*-hez hasonló egérből és humánból származó fehérjék hisztamin felszabadítása IgE-függő. Ez a felfedezés, valamint a bindin fehérjékkel való hasonlóság arra enged következtetni, hogy ennek a géncsaládnak a tagjai, így az *msc27* is, bizonyos fehérje-fehérje kölcsönhatások során játszanak szerepet.

Southern hibridizációs kísérletben az *msc27*-ről kimutattuk, hogy a különböző lucerna fajták genomjában feltehetően több, kismértékben eltérő szekvenciájú gén található. Ez a tény megerősíti azt a feltételezést, hogy ez a gén igen fontos feladatot lát el az élő szervezetben, és esetleges mutációja esetén egy másik, hasonló gén veheti át a szerepét. Annak ismeretében, hogy burgonyában már kimutatták az *msc27*-tel homológ gén jelenlétét, a hibridizáció hiánya a burgonya genomi DNS-hez feltehetően azzal magyarázható, hogy a kísérlet körülményeinek beállítása nem tette lehetővé a próba hibridizálását ehhez a DNS-hez. Valószínűleg ugyanezzel magyarázható a hibridizáció hiánya a kukorica genomi DNS-éhez. Bár kukoricából még nem izoláltak hasonló szekvenciájú gént, de nem valószínű, hogy ez az erősen konzerválódott gén ebből a magasabbrendű növényfajból hiányozna.

Northern hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy az *msc27* gén stabilan és erősen fejeződik ki lucernában. A különböző hormonkezeléseknek kevés hatása volt a megnyilvánulás erőségére. Lucerna különböző szerveiben is csak kisebb eltéréseket mutatott a gén kifejeződése. Az *Msc27*-tel homológ egér tumor fehérjéről kimutatták, hogy igen magas szinten fejeződik ki, és az átíródott mRNS ribonukleoprotein formájában raktározódik a sejtekben. Emlősök esetében a gének szabályozásának elterjedt formája ez. Bizonyos gének nagy mennyiségben íródnak át mRNS-sé. Ezen mRNS-eknek csak kis része íródik át fehérjévé, nagyobb részét a transzlációs gépezet számára hozzáférhetetlen ribonukleoprotein formájában tárolják a sejtek (Bergman és mtsai., 1982). Feltételezések vannak arra, hogy szükség esetén a sejtek képesek mozgósítani ezeket a tartalékokat, és a sejtek igényeinek megfelelően módosítani az transzlációs apparátus számára hozzáférhető mRNS mennyiségét. Ezzel a mechanizmussal a sejt a transzláció szintjén

képes szabályozni termelődő fehérje mennyiségét. Lehetséges, hogy az *Msc27* fehérje termelésének szabályozása is hasonló mechanizmussal történik. Ez megerősíti ennyiségben termelődhetnek az előbbieken vázolt transzlációs szabályozási mechanizmus segítségével.

In situ hibridizációs kísérletek segítségével kimutattuk, hogy az *msc27* gén, mind a fiatal, mind az idős gyökérgümőkben főleg az inváziós zónában fejeződik ki, így a gyökérgümőn belül jelentős eltérések vannak a génkifejeződésében. Ez az eredmény nem volt kimutatható Northern hibridizációval, ami kihangsúlyozza az *in situ* hibridizációs technika jelentőségét és szükségességét a különböző gének kifejeződésének vizsgálatakor. Lehetséges, hogy az *msc27* mRNSének nagyfokú stabilitása miatt Northern hibridizáció nem elég érzékeny módszer a kifejeződésbeli különbségek kimutatásához. Erős és stabil kifejeződése alapján az *msc27* gén a hormon kezelési és Nod faktorok hatását vizsgáló Northern hibridizációs kísérletekben jól alkalmazható belső kontrollként az RNS minták eltérő minőségéből eredő kísérleti hibák kimutatására (Györgyey és mtsai., 1991; Allison és mtsai., 1993; Bauer és mtsai., 1995; jelen dolgozat 5.2. fejezete).

7. Összefoglalás

Ennek a doktori dolgozatnak a keretein belül a *Medicago-Rhizobium meliloti* szimbiózis kezdeti lépéseiben résztvevő gének jellemzése során elért eredményeket mutattam be, valamint tárgyaltam ezen eredmények újszerűségét és a belőlük levonható következtetések jelentőségét a *Medicago-Rhizobium meliloti* szimbiózis megismerésében. Ezen túlmenően bemutattam az *in situ* hibridizációs technika beállításában elért eredményeket, és a technika jelentőségét a gének kifejeződésének tanulmányozásában.

Elsőként a lucerna *enod12* korai nodulin génjét jellemeztem, amely a növényi gének közül az első között indukálódik a Nod faktorok hatására. A sikeresen beállított *in situ* hibridizációs technika segítségével kimutattuk, hogy a gén a gyökérgümő inváziós zónájában fejeződik ki. Elsőként vizsgáltuk az *enod12* korai nodulin gén hatását a gümőképződésre és a nitrogénkötésre olyan növényi mutánsok segítségével, amelyek genomjukban nem hordozták az *enod12* gént. A gén öröklődésének nyomonkövetése során kiderült, hogy az *enod12* genotípus egy null allél öröklődésének következménye. Az eredmények azt mutatták, hogy az *enod12* hiánya semmilyen hatással nem volt az általunk használt diploid fajok keresztezéséből származó növények életképességére, valamint az ezeken a növényeken képződött gümők kialakulására és nitrogénkötésére.

A gümőképződés elengedhetetlen feltétele a növényi sejtciklus reaktiválása, amely a gümő primordium kialakulásához vezet. Másodikként a sejtosztódási ciklusban aktív szerepet játszó ciklinek közül két *Medicago* ciklin gén jellemzését mutattam be. Az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy a *CyclIIMs* egy mitotikus ciklin, amely a G2-M fázisok közötti

átmenetnél játszik szerepet, és amelynek kifejeződése a lucerna különböző szerveiben az osztódószövetek mennyiségével mutat korrelációt. A *CycSMs* gén kifejeződése a sejtciklus folyamán arra utalt, hogy az A-típusú ciklinek csoportjába tartozik. Ez volt az első alkalom, hogy *Medicago*-ból A-típusú ciklin került jellemzésre.

Harmadikként egy új, erősen kifejeződő lucerna gént, az *msc27*-et jellemeztük. Kimutattuk, hogy az *msc27* egy olyan géncsaládhoz tartozik, amelynek tagjai erős homológiát mutatnak egymáshoz. Az általunk használt hormon kezeléseknek csekély hatása volt az *msc27* kifejeződésére. Lucerna gyökérben és gumóban is közel azonos szinten fejeződött ki. *Azin situ* hibridizációs technika azonban feltárta, hogy a gyökérgumón belül jelentős eltérések vannak az *msc27* gén kifejeződésében. Ez az eredmény kihangsúlyozza az *in situ* hibridizációs technika jelentőségét a molekuláris biológiai kutatásokban.

A dolgozatban bemutatott és megvitatott eredmények rámutatnak, hogy a *Medicago* és a *Rhizobium* között kialakuló szimbiózis igen bonyolult és sok lépésben szabályozott folyamat, amely kiváló lehetőséget nyújt a legkülönbözőbb irányú tudományos kutatásokra. A terület intenzíven tanulmányozott, aminek köszönhetően egyre több információ áll rendelkezésünkre a szimbiózis kialakulásáról, a gumóképződésről, a nitrogénkötés folyamatáról, valamint ezek szabályozásáról. Ezek az ismeretek hasznosak lehetnek a továbbiakban egy hatékonyabb, és környezetkímélőbb mezőgazdasági termelés kialakításához.

8. Angol nyelvű összefoglaló (Abstract)

Characterization of *enod12*, cyclins and *msc27* genes and their expression in *Medicago*.

Rhizobia (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* sp.) are able to induce the formation of nitrogen fixing nodules on roots, or in some cases on the stem of leguminous plants. During this symbiotic interaction both prokaryotic and eukaryotic partners benefit. In nodules, bacteria carry out biological nitrogen fixation, which represents a source of nitrogen for the plant. The plant, in turn, provides the rhizobia with carbon source and creates the correct biological niche for its proliferation and nitrogen fixation within the nodule. The organogenesis of nitrogen fixing nodules is controlled by a complex network of signals which are produced both by rhizobia and by the plant. During root nodules formation, infection and nodule organogenesis take place simultaneously. Flavonoid-types signal molecules exuded by the host plant root in conjunction with the bacterial activator NodD proteins induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium* sp. These bacterial nodulation genes are involved in the synthesis of the bacterial signal molecules, the Nod factors. Nod factors are small lipooligosaccharide molecules with various modifications that regulate their activities. Nod factors induce nodule morphogenesis in the host plants. Nodule organogenesis starts with membrane depolarization and root hair curling at the surface of the plant root. At the same time, in the root cortex, Nod factors reactivate the cell division of the already differentiated root cortical cells. In the inert root cortex, cells undergo subsequent cell divisions which lead to the formation of the nodule primordia. In contrast, cells of outer root cortex are arrested in the G2 phase, shortly after reactivation of the cell cycle. These cells undergo an intracellular reorganization leading to the formation of the plant tubular structures, the infection threads. Bacteria trapped in the curled root hair enter the plant cells by this newly synthesized infection threads, which separate rhizobia from the plant cell organs during the infection process. Nod factors are also able to induce the expression of several early nodulin genes, which are plant genes specifically expressed during nodule formation. Therefore, symbiosis and nodule organogenesis are ideal systems to study gene expression and regulation, signal perception and transduction, the reactivation of the cell cycle, etc...

During my thesis work, I focused on the characterization of different *Medicago* genes expressed during nodule organogenesis induced by *Rhizobium meliloti*. I discuss the novelty and importance of these results in the understanding of the symbiosis between *Medicago* and *Rhizobium meliloti*.

I started my thesis work by characterizing the early nodulin gene, *enod12* from alfalfa. This gene is induced by Nod factors early after infection with *Rhizobium* sp. Based on the deduced

amino acid sequence Enod12 putative protein belongs to the family of hydroxyproline-rich proteins which are known to participate in the plant cell wall formation. Despite of intensive studies, the function(s) of *enod12* is still unknown. However, based on the sequence homology and expression pattern studies, they are believed to play an important role in the infection process and nodule formation.

We first studied the spatial expression of *enod12* gene in *Medicago* root nodules by *in situ* hybridization. After setting up the experimental conditions, which is a very important step for *in situ* hybridization, we revealed that *enod12* is expressed in the infection zone in both young and mature root nodules of *Medicago*. This expression pattern suggests, that *enod12* play a role in the infection processes and it may participate in the formation of newly synthesized cell walls during the infection.

To further explore the role of *enod12* early nodulin, we characterized diploid *Medicago* plants that naturally carry different copy numbers of *enod12* in their genomes, or completely lack the *enod12* gene. The diploid *M. sativa* ssp *coerulea* w2 (Mcw2) carries two *enod12* genes showing sequence similarities to *enod12A* and *enod12B* isolated from the tetraploid *M. sativa* ssp *sativa*. The diploid *M. sativa* ssp *quasifalcata* k93 (Mqk93) carries only one *enod12* gene similar to the one found in *M. truncatula*. We followed the heritage of *enod12* genes in the progeny of crosses between Mcw2 and Mqk93. Genetic analyses of the F1 progeny revealed that several plant individuals inherited only one allele of *enod12* coming from Mqk93. F1/1 was one of them. In the F2 progeny obtained by self pollination of F1/1 plant, individuals lacking the *enod12* gene in their genome appeared. These results can be explained by the inheritance of a null allele, originating from Mcw2. Individual plants of F2 progeny which lack the *enod12* gene carry only the null alleles. Surprisingly, the viability of the *enod12* deficient plants was similar to that of their parents. After infection with *R. meliloti*, these *enod12*⁻ plants were able to form nodules similar in structure to wild type nodules. No *enod12* gene expression was detectable in these nodules. Moreover, these *enod12*-deficient plants could fix nitrogen as efficiently as the parent plants. We, therefore, concluded that in these diploid subspecies of *Medicago* either *enod12* is not required for nodule formation and nitrogen fixation, or other gene(s), probably belonging to the hydroxyproline-rich protein family, could replace the function of *enod12*. Mapping of *enod12* gene in Mcw2 and Mqk93 revealed, that *enod12* is located at the end of the chromosome3 of *Medicago*. Thus, the appearance of the null allele in Mcw2 can be explained by the fact that over evolution chromosome3 may have lost the end portion containing the *enod12* gene. The heterozygous nature of these leguminous plants can be exploited for the identification and characterization of mutated alleles of other nodulin genes.

Nodule formation requires the reactivation of the cell cycle during early phase of symbiotic interaction. When I started my thesis work, the genes participating in the regulation of *Medicago* cell cycle and their mechanisms of action were poorly characterized. The key regulatory elements controlling the cell division cycle are highly conserved in all eucaryotes. The most important

regulatory elements are cyclins in association with cyclin-dependent protein kinases (CDKs). The expression of most cyclin genes fluctuate during the cell cycle, and based on their appearance and role in the cell cycle, cyclins are divided into several classes. In the second part of my thesis, I characterized two alfalfa cyclin genes, *CyclIIIMs* and *CycSMs*. *CyclIIIMs* was the first full length cyclin cDNA isolated from *Medicago*. The other cyclin cDNA, *CycSMs*, was only a partial sequence of the gene sparing the C-terminal part of the cyclin box sequence. Nucleotide sequence comparison and Southern blot analyses of these two *Medicago* cyclin genes suggested, that *CyclIIIMs* and *CycSMs* belong to two different classes of plant cyclins. This was supported by the differences in the expression patterns of the two cyclin genes during cell cycle.

In a partially synchronized alfalfa cell culture *CyclIIIMs* was highly expressed during G2/M cell cycle transition. Based on this result and on the sequence homology of *CyclIIIMs* to mammalian B-type cyclins, we concluded that this cyclin belongs to the class of mitotic cyclins. Moreover, the level of expression of *CyclIIIMs* in different organs of alfalfa showed correlation with the level of cell division activity within the organ, indicating that the expression of this gene is cell cycle dependent.

The expression of *CycSMs* gene was the highest in the early S-phase in a partially synchronized alfalfa cell culture. After the S-phase, the level of expression dropped, but a low level of expression was observed throughout the cell cycle. This expression pattern suggested, that *CycSMs* belongs to the family of A-type cyclins which are important during the DNA replication as well as in G2 interphase. *CycSMs* was the first A-type cyclin characterized from *Medicago*. Recent data suggests, that the cyclins homologues to *CycSMs* may control re-entry of quiescent, G0-arrested cells into the G1 phase of the cell cycle.

The third part of my thesis work consisted in the characterization of *msc27*, a new *Medicago* gene isolated from alfalfa cell suspension. This gene is highly and stably expressed in these cells before and after 2,4-D treatment.. Sequence analysis of *msc27* gene revealed that the gene belongs to a gene family first isolated from mouse and human, and characterized as translationally controlled tumor proteins. Homologues of *msc27* were isolated from several plant and animal species and all of them showed significantly high homology to each other. This suggests that the putative Msc27 homologue proteins might be very important for cells, and thus, they remained almost unaltered by evolution.

We further examined the expression of *msc27* in alfalfa cell suspension treated with 2,4-D or other plant hormones belonging to different classes of hormones, at different concentrations. The *msc27* was highly expressed in untreated alfalfa cell culture which was slightly altered after hormone treatments. Furthermore, the *msc27* gene expression also did not vary significantly in different organs of *Medicago*. There was no significant difference in the level of expression in root or nodules, suggesting that *msc27* expression is not influenced by Nod factors. However, *in situ* hybridization revealed, that the *msc27* is mostly expressed in the infection zone of young and old nodules. Thus, we concluded that *msc27* gene expression is differentially regulated within

Medicago root nodules. This regulation of *msc27* expression at the transcriptional level could not be demonstrated by Northern hybridization which points out the importance of *in situ* hybridization technique in molecular biological studies.

The data presented in this thesis improved our knowledge on the genes participating in nodule organogenesis, and also raised questions which open the way to new studies for better understanding the interaction between *Medicago* and *Rhizobium*.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, akik lehetővé tették és segítettek ennek a doktori dolgozatnak a létrejöttét:

Dr. Kondorosi Ádámnak, Dr. Kondorosi Évának és Dr. Dudits Dénesnek, akik intézetükbe, illetve csoportjukba befogadtak, irányították és ellenőrizték a tudományos munkámat, valamint segítettek a kézirat elkészítését.

Dr. Györgyey Jánosnak és Kiss Emőnek a tudományos segítségért és a kézirat javításáért.

Dr. Petrovics Györgynek, Dr. Fehér Attilának, Dr. Preiszner Johannának és Dr. Mai Antalnak a hasznos tudományos ötletekért, amelyek nagyban segítettek a munka előrehaladását, valamint barátságukért.

A csoport összes tagjának mind Magyarországon, mind Franciaországban, amiért befogadtak maguk közé és erejükből telően segítettek a munkámat, valamint megosztották velem szabadidejük drága perceit.

Férfiemnek, Mohammed Bendahmane-nek, aki mind tudományosan, mind érzelmileg nagyban hozzájárult a dolgozat elkészítéséhez.

Kislányomnak, Édesanyámnak, Hugomnak Nagyszüleimnek és összes barátomnak, akik mindig mellettem álltak.

Ez a dolgozat különböző ösztöndíjak segítségével készülhetett el:

- A Francia kormány által megítélt ösztöndíj,
- A Közöspiaci országok által adományozott ösztöndíj,
- A CNRS és az MTA "Jumelage" együttműködési keretén belül nyújtott ösztöndíj.

10. Saját publikációk listája

10.1. Az értekezés tárgyköréhez tartozó publikációk listája.

Bauer, P, Crespi, M.D., Szécsi, J., Allison, L.A., Schultze, M., Ratet, P., Kondorosi, É. and Kondorosi, Á. (1994). Alfalfa *enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. Plant Physiology 105: 585-592

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

Szécsi, J., Savouré, A., Fehér, A., Dedeoglu, D., Györgyey, J., Brown, S., Dudits, D., Kondorosi, Á. and Kondorosi, É. (1994). Isolation and characterization of *Medicago* cyclin genes. In: Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference, Eds. Kiss G.B. and Endre G., Officina press, Szeged, Hungary, pp. 331.

Savouré, A., Fehér, A., Kaló, P., Petrovics, Gy., Csanádi, Gy., Szécsi, J., Kiss, Gy.B., Brown, S., Kondorosi, Á. and Kondorosi, É. (1995). Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone *CyclIIIMs* from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. Plant Mol. Biol. 27, 1059-1070.

10.2. Egyéb publikációk.

Grosskopf, E., Ha, D.T.C., Wingender, R., Röehring, H., Szécsi, J., Kondorosi, É., Shell, J. and Kondorosi, Á. (1993) Enhanced level of chalcon synthase in alfalfa nodules induced by a fix negative mutant of *Rhizobium meliloti*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 173-181.

Kondorosi, É., Hoffman, B., Endre, G., Bögre, L., Koncz, Cs., Dudits, D., Szécsi, J., Kiss, G.B. and Kondorosi, A. (1993) Involvement of hormones in nodule initiation: auxin sensitivity and hormone balance affect nodulation of *Medicago*. In: New Horizons in Nitrogen Fixation, Eds. Palatios R., Mora J. and Newton W.E., Kluwer, Dordrecht, pp. 357.

Szécsi, J., Ding, X.S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., Nelson, R.S. and Beachy, R.N. Development of tobacco mosaic virus infection sites in *Nicotiana benthamiana*. Mol. Plant-Microbe Interact. (elfogadva).

Szécsi, J., Ding, X.S., Lim, C.O., Bendahmane, M., Cho, M.J., Nelson, R.S. and Beachy, R.N. (1998) Development of tobacco mosaic virus infection sites in *Nicotiana benthamiana*. 17th Annual Meeting of American Society for Virology, Vancouver, BC, Kanada. (poszter)

Bendahmane, M., Duncan, B.S., **Szécsi, J.**, Olson, A. and Beachy, R.N. (1998) Molecular and structural studies of CP-MR to TMV. Evidence of interference of the transgenic CP with viral disassembly. 17th Annual Meeting of American Society for Virology, Vancouver, BC, Kanada. (előadás)

11. Felhasznált irodalom

- Aguilar, J.M.M., Ashby, A.M., Richards, A.J.M., Loake, G.J., Watson, M.D. and Shaw, C.H. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2741-2746.
- Allen, T., Raja, S., Ganter, G. and Dunn, K. (1992) Sequential expression of two late nodulin genes in the infected cells of alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 430-434.
- Allen, T., Raja, S. and Dunn, K. (1991) Cells expressing ENOD2 show differential spatial organization during the development of alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 139-146.
- Allison, L.A., Kiss, G.B., Bauer, P., Poiret, M., Pierre, M., Savouré, A., Kondorosi, É. and Kondorosi, Á. (1993) Identification of two alfalfa early nodulin genes with homology to members of the pea *Enod12* gene family. *Plant. Mol. Biol.* **21**, 375-380.
- Aman, P., McNeil, M., Franzen, L.-E., Darvill, A.G. and Albersheim, P. (1981) Structural elucidation, using HPLC-MS and GLC-MS, of the acidic exopolysaccharide secreted by *Rhizobium meliloti* strain Rm2011. *Carbohydr. Res.* **114**, 277-285.
- Amon, A., Tyers, M., Fletcher, M. and Nasmith, K. (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**, 993-1007.
- Andersson, C.R., Jensen, E.O., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S. and Peacock, W.J. (1996) A new hemoglobin gene from soybean: A role for hemoglobin in all plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5682-5687.
- Appelbaum, E.R., Thompson, D.V., Idler, K. and Chartrain, N. (1988) *Rhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J. Bacteriol.* **170**, 12-20.
- Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarié, J. and Truchet, G. (1994) *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357-1374.
- Armitage, J.P., Gallagher, A. and Johnston, A.W.B. (1988) Comparison of the chemotactic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. *Mol. Microbiol.* **2**, 743-748.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Bánfalvi, Z. and Kondorosi, Á. (1991) Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 113-124.
- Bakhuizen, R. (1988) The plant cytoskeleton in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Ph.D. dissertation (Leiden University, Leiden, Netherlands)
- Barnett, M.J. and Long, S.R. (1990) DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: *SyrM* has sequence similarity to *NodD* proteins. *J. Bacteriol.* **172**, 3695-3700.
- Barnett, M.J., Rushing, B.G., Fisher, R.F. and Long, S.R. (1996) Transcription start sites for *syrM* and *nodD3* flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **178**, 1782-1787.
- Batut, J., Daveran-Mingot, M.L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M. and Khan, D. (1989) *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* **8**, 1279-1286.
- Bauer, P., Crespi, M. D., Szécsi, J., Allison, L.A., Schultze, M., Ratet, P., Kondorosi, É. and Kondorosi, Á. (1994) Alfalfa *Enod12* genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol.* **105**, 585-592.
- Baulcombe, D. and Verma, D.S.P. (1978) Preparation of a complementary DNA for leghaemoglobin and direct demonstration that leghaemoglobin is encoded by the soybean genome. *Nucleic Acids Res.* **5**, 4141-4153.
- Bánfalvi, Z. and Kondorosi, Á. (1989) Production of root hair deformation factors by *Rhizobium meliloti* nodulation genes in *Escherichia coli*: *hsnD* (*nodH*) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. *Plant Mol. Biol.* **13**, 1-12.
- Bánfalvi, Z., Kondorosi, É. and Kondorosi Á. (1985) *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. *Plasmid* **13**, 129-138.

- Bánfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusa, I. and Kondorosi, Á. (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 318-125.
- Bergmann, H., Preddie, E. and Verma, D.S.P. (1983) Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**, 2333-2339.
- Bergmann, I.E., Cereghini, S., Geoghegan, T. and Brawerman, G. (1982) Functional characteristics of untranslated messenger ribonucleoprotein particles from mouse sarcoma ascites cells. Possible relation to the control of messenger RNA utilization. *J. Mol. Biol.* **156**, 567-582.
- Bergman, K., Gulash-Hofee, M., Hovestadt, R.E., Larosiliere, R.C., Ronco, P.G. and Su, L. (1988) Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: Evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* **170**, 3249-3254.
- Beynon, J.L., Williams, M.K. and Cannon, F.C. (1988) Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti* *nifA* gene. *EMBO J.* **7**, 7-14.
- Bhat, U.R., Mayer, H., Yokota, A., Hollingsworth, R.I. and Carlson, R.W. (1991) Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic-acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **173**, 2155-2159.
- Bogusz, D., Appleby, C.A., Landsmann, J., Dennis, E.S., Trinick, M.J. and Peacock, W.J. (1988) Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature* **331**, 178-180.
- Boulnois, G.J. and Jann, K. (1989) Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Mol. Microbiol.* **3**, 1819-1823.
- Bowra, B.J. and Dilworth, M.J. (1981) Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 231-235.
- Böhm, H., Benndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nurnberg, P., Kraft, R., Otto, A. and Bielka, H. (1989) The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.* **19**, 277-286.
- Brisson, N. and Verma, D.P.S. (1982) Soybean leghemoglobin gene family: Normal, pseudo, and truncated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4055-4059.
- Bueno, A., Richardson, H., Reed, S.I. and Russell, P. (1991) A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* **66**, 149-159.
- Burkardt, B. and Burkardt, H.-J. (1984) Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. *J. Mol. Biol.* **175**, 213-218.
- Burkardt, B., Schillik, D. and Pühler, A. (1987) Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasms. *Plasmid* **17**, 13-25.
- Caetano-Anolland, G. and Gresshoff, P.M. (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 345-382.
- Caetano-Anolland, G., Christ-Estes, D.K. and Bauer, W.D. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* **170**, 3164-3169.
- Callaham, D.A. and Torrey, J.G. (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**, 1647-1664.
- Carlson, R.W. (1982) Surface chemistry. In: Ecology of Nitrogen Fixation, volume 2, *Rhizobium*. 199-234. Oxford: Oxford University Press.
- Carlson, R.W., Price, N.P.J. and Stacey, G. (1995) The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 684-695.
- Carrion, M., Bhat, U.R., Rehus, B. and Carlson, R.W. (1990) Isolation and characterisation of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **172**, 8-15.
- Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. and Brawerman, G. (1988) Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cell. *Nuc. Acids Res.* **16**, 2350.
- Christiansen, H., Hansen, A.C., Vijn, I., Pallisgraad, N., Larsen, K., Yang, W.C., Bisseling, T., Marcker, K.A. and Jensen, E.O. (1996) A novel type of DNA-binding protein interacts with conserved sequence in early nodulin *ENOD12* promoter. *Plant Mol. Biol.* **32**, 809-821.
- Coba de la Pena, T., Frugier, F., McKhann, H.I., Bauer, P., Brown, S., Kondorosi, Á. and Crespi, M. (1997) A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J.* **11**, 407-420.

- Colasanti, J., Tyers, M. and Sundaresan, V. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3377-3381.
- Cook, D.R., VandenBosch, K., de Bruijn, F.J. and Huguet, T. (1997) Model legumes get the nod. *Plant Cell* **9**, 275-281.
- Corich, V., Goormachtig, S., Lievens, S., Van Montgu, M. and Holsters, M. (1998) Patterns of *ENOD40* gene expression in stem-born nodules of *Sesbania rostrata*. *Plant Mol. Biol.* **37**, 67-76.
- Cren, M., Kondorosi, Á. and Kondorosi, É. (1995) *NolR* controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* **15**, 733-747.
- Cren, M., Kondorosi, Á. and Kondorosi, É. (1994) An insertional point mutation inactivates *NolR* repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* **176**, 518-519.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, É. and 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, G., Szécsi, J., Kaló, P., Kiss, P., Endre, G., Kondorosi, Á., Kondorosi, É. and 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.
- Currier, W.W. (1980) Chemotaxis of a Birdsfoot trefoil strain of *Rhizobium* to simple sugar. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**, 43-46.
- Currier, W.W. and Strobel, G.A. (1976) Chemotaxis of *Rhizobium* ssp. to plant root exudates. *Plant Physiol.* **57**, 820-823.
- Da Re, S., Bertagnoli, S., Fourment, J., Reyrat, J.M. and Khan, D. (1994) Intramolecular signal transduction within the FixJ transcriptional activator: *In vitro* evidence for the inhibitory effect of the phosphorylatable regulatory domain. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1555-1561.
- Dahl, M., Meskiene, I., Bögre, L., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Hubmann, R., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. (1995) The D-type alfalfa cyclin gene *cycMs4* complements G(1) cyclin-deficient yeast and is induced in the G(1) phase of cell cycle. *Plant Cell* **7**, 1847-1857.
- Dart, P. (1977) Infection and development of leguminous nodeles. In *A Treatise on Dinitrogen Fixation* (Hardy R.W.F. and Silver V.S., eds.), Sect. III, 367-472. John Wiley, New York.
- David, M., Daveran, M.-L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. and Khan, D. (1988) Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**, 671-683.
- de Billy, F., Baker, O.G., Gallusci, P. and Truchet, G. (1991) Leghaemoglobin gene expression is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen fixing root nodule of alfalfa. *Plant Journal* **1**, 27-37.
- Dénarié, J. and Cullimore, J. (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**, 951-954.
- Debellé, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E., Dénarié, J. and Truchet, G. (1986) Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **168**, 1075-1086.
- Dehio, C. and de Bruijn, F.J. (1992) The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbaniana rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant J.* **2**, 117-128.
- Demont, N., Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D., Ferro, M., Promé, J.C. and Dénarié, J. (1994) The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acetylated by hydroxylated fatty acids. *EMBO J.* **13**, 2139-2149.
- Deshais, R.J., Chau, V. and Kirschner, M. (1995) Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc43p-dependent pathway. *EMBO J.* **14**, 303-312.
- Dickstein, R., Prusty, R., Peng, T., Ngo, W. and Smith, M.E. (1993) *ENOD8*, a novel early nodule-specific gene, is expressed in empty alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 715-721.
- Dickstein, T., Bisseling, T., Reinhold, V.N. and Ausubel, F. (1988) Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev.* **2**, 677-687.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. and Kim, C.-H. (1987) The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* **169**, 3217-3223.

- Djordjevic, M.A., Schofield, P.R. and Rolfe, B.G. (1985) Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 463-471.
- Dowdy, S.F., Hinds, S.F., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A. and Weinberg, R.A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**, 499-511.
- Draetta, G. (1993) *cdc2* activation: the interplay of cyclin binding and Thr161 phosphorylation. *Trends Cell Biol.* **3**, 287-289.
- Dulic, V., Lees, E. and Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* **257**, 1958-1961.
- Dunn, K., Dickstein, R., Feinbaum, R., Burnett, B.K., Peterman, T.K., Thoidis, G., Goodman, H.M. and Asubel, F.M. (1988) Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**, 66-74.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R. and Ditta, G. (1986) *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4403-4407.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M. and Long, S.R. (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**, 998-1000.
- Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1994) Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 847-852.
- Fang, Y. and Hirsch, A.M. (1998) Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulating factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* **116**, 53-68.
- Feiler, H.S. and Jacobs, T.W. (1991) Cloning of a pea *cdc2* homologue by efficient immunological screening of PCR products. *Plant Mol. Biol.* **17**, 321-333.
- Felle, H.H., Kondorosi, A., Kondorosi, E. and Schultze, M. (1995) Nod signal-induced plasma membrane changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant Journal* **7**, 939-947.
- Felle, H.H., Kondorosi, A., Kondorosi, E. and Schultze, M. (1996) Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant Journal* **10**, 295-301.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., Villarroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991) The *Arabidopsis* functional homologue of the p34^{cdc2} protein kinase. *Plant Cell* **3**, 531-540.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., de Almeida Engler, J., van Montagu, M., Engler, G. and Inzé, D. (1994a) Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* **6**, 1763-1774.
- Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., de Almeida Engler, J., Bergounioux, C., Brussels, S., van Montagu, M. and Inzé, D. (1994b) Three different classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11313-11317.
- Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C. and Singer, E.R. (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* **40**, 869-877.
- Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F. and Singer, E.R. (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamin synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**, 66-72.
- Fischer, H.-M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**, 352-368.
- Fischer, R.F. and Long, S.R. (1992) *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Fisher, R.F. and Long, S.R. (1989) DNA footprint analysis of the transcriptional activator proteins NodD1 and NodD3 on inducible *nod* gene promoters. *J. Bacteriol.* **171**, 5492-5502.
- Fisher, R.F. and Long, S.R. (1993) Interaction of NodD at the nod box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* **233**, 336-348.
- Fisher, R.F., Tu, J.K. and Long, S.R. (1985) Conserved nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1432.
- Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**, 713-724.
- Fobert, P.R., Coen, E.S., Murphy, G.J. and Doonan, J.H. (1994) Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO J.* **13**, 616-624.

- Franssen, H., Nap, J.P., Gloudemans, T., Stiekema, W., Van Dam, H., Govers, F., Louwerse, J., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1987) Characterization of cDNA for nodulin-75 of soybean: A gene product involved in early stage of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4495-4499.
- Franssen, H., Vijn, I., Yang, W.C. and Bisseling, T. (1992) Developmental aspects of the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Plant Mol. Biol.* **19**, 89-107.
- Gamas, P., de Carvalho Niebel, F., Lescure, N. and Cullimore, J.V. (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 233-242.
- Gaworzewska, E.T. and Carlile, M.J. (1982) Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1179-1188.
- Gilles-Gonzales, M.A., Ditta, G.S. and Helinski, D.R. (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **350**, 170-172.
- Gitte, R.R., Vittal Rai, P. and Patil, R.B. (1978) Chemotaxis of *Rhizobium* sp. towards root exudate of *Cicer arietinum* L. *Plant Soil* **50**, 553-566.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Gloudemans, T., De Vries, S., Bussink, H.J., Malik, N.S.A., Franssen, H.J., Louwerse, J. and Bisseling, T. (1987) Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* **8**, 395-403.
- Goethals, K., Van Montagu, M. and Holsters, M. (1992) Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1646-1650.
- Goormachtig, S., Lievens, S., Van de Velde, W., Van Montagu, M. and Holsters, M. (1998) *Srchi13*, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. *Plant Cell* **10**, 905-916.
- Gould, K.L. and Nurse, P. (1989) Tyrosin phosphorylation of the fission yeast *cdc2* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
- Govers, F., Gloudemans, T., Moerman, M., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1985) Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* **4**, 861-867.
- Govers, F., Harmsen, H., Heindstra, R., Michielsen, P., Prins, M., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1991) Characterization of the pea *ENOD12B* gene and expression analyses of the two *ENOD12* genes in nodule, stem and flower tissue. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 160-166.
- Govers, F., Nap, J.P., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1987) Nodulins in the developing root nodule. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 309-322.
- Göttfert, M., Holzhausen, D., Bani, D. and Hennecke, H. (1992) Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 257-265.
- Göttfert, M., Horváth, B., Kondorosi, É., Putnoky, P., Rodriguez-Qiones, F. and Kondorosi, Á. At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **191**, 411.
- Götz, R., Limmer, N., Ober, K. and Schmitt, R. (1982) Motility and chemotaxis in two strain of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 789-798.
- Greene, E.A., Erard, M., Dedieu, A. and Barker, D.G. (1998) *MtENOD16* and *20* are members of a family of phytocyanin-related early nodulins. *Plant Mol. Biol.* **36**, 775-783.
- Guinel, F.C. and LaRue, T.A. (1991) Light microscopy study of nodule initiation in *Pisum sativum* L. cv. Sparkle and its low nodulation mutant E2 (*sym5*). *Plant Physiol.* **97**, 1206-1211.
- Gussin, G.N., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M. (1986) Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 567-591.
- Györgyey, J. (1996) Kandidátusi disszertáció.
- Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E. and Dudits, D. (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**, 999-1007.
- Györgypál, Z. and Kondorosi, Á. (1991) Homology of the ligand-binding regions of *Rhizobium* symbiotic regulatory protein NodD and vertebrate nucleare receptors. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 337-340.

- Györgypál, Z., Iyer, N. and 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. and Kondorosi, Á. (1991a) Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD protein. *BioEssays* **13**, 575-581.
- Hardi, A.-E. and Bisseling, T. (1998) Responses of the plant to Nod factors. In: The Rhizobiaceae. Molecular Biology of model plant-associated bacteria. Eds. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. Kluwer Acad. Publish., 403-416.
- Hardy, R.W.F. and Havelka, U.D (1975) Nitrogen fixation research: a key to world food? *Science* **188**, 633-643.
- Hart, G.W., Brew, K., Grant, G.A., Bradshaw, R.A. and Lennarz, W.J. (1979) Primary structural requirements for the enzymatic formation of the *N*-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with natural and synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **254**, 9747-9753.
- Hartwell, L.H. and Weiner, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.
- Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh, E.A. and Kikuchi, Y. (1992) Isolation and characterisation of cDNA clones encoding *cdc2* homologues from *Oryza sativa*: A functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 10-16.
- Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I. and Ishii, T., (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* **10**, 2681-2688.
- Heidecker, G. and Messing, J. (1986) Structural analysis of plant genes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 439-466.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**, 787-797.
- Heidstra, R., Nielsen, G., Martinez-Abarca, F., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1997) Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 215-220.
- Hemerly, A.S., Ferreira, R., de Almeida engler, J., van Monagu, M., Engler, G. and Inze, D. (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**, 1711-1723.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. and Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Biochemistry* **85**, 6602-6606.
- Her, G.R., Glazebrook, J., Walker, G.C. and Reinhold, V.N. (1990) Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm2011. *Carbohydr. Res.* **198**, 305-312.
- Hirayama, T., Imajuku, Y., Anai, T., Matsui, M. and Oka, A. (1991) Identification of two cell-cycle-controlling *cdc2* gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **105**, 159-165.
- Hirsch, A.M. (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211-237.
- Hirsch, A.M. and Fang, Y. (1994) Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Mol. Biol.* **26**, 5-9.
- Hirsch, A.M., Bhuvaneswari, T.V., Torrey, J.G. and Bisseling, T. (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowth elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1244-1248.
- Hirt, H. (1996) In and out of the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* **31**, 459-464.
- Hirt, H., Mink, M., Bögre, L., Györgyei, J., Jonak, J., Gartner, A., Dudits, D. and Heberle-Bors, E. (1992) Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell* **4**, 1531-1538.
- Hirt, H., Páy, A., Bögre, L., Meskiene, I. and Heberle-Bors, E. (1993) *cdcMsB*, a cognate *cdc2* gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant J.* **4**, 61-69.
- Hirt, H., Páy, A., Györgyei, J., Bakó, L., Németh, K., Bögre, L., Schweyen, R.J., Heberle-Bors, E. and Dudits, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologue to p34^{cdc2}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1636-1640.
- Honma, M.A. and Ausubel, F.M. (1987) *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8558-8562.

- Horváth, B., Bachem, C.W.B., Schell, J. and Kondorosi, Á. (1987) Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**, 841-848.
- Horváth, B., Heidstra, R., Lados, M., Moerman, M., Spaink, H.P., Promé, J.-C., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1993) Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *Plant J.* **4**, 727-733.
- Horváth, B., Kondorosi, É., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgypál, Z., Barabás, I., Wieneke, U., Schell, J. and Kondorosi, Á. (1986) Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* **46**, 335-343.
- Hotter, G.S. and Scott, D.B. (1991) Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. *J. Bacteriol.* **173**, 851-859.
- Huguet, T., Pichon, M., Journet, E.P., de Billy, F., Barker, D. and Truchet, G. (1993) Alfalfa in the absence of *Rhizobium*: A physiologically and genetically complex process. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. (Palacios, R. *et al.*, eds.), 347. Kluwer, Dordrecht.
- Hunt, T., Luca, F.C. and Ruderman, J.V. (1992) The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycle of the clam embryo. *J. Cell Biol.* **116**, 707-724.
- Hynes, M.F., Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M. and Pühler, A. (1986) The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 356-362.
- Jann, B. and Jann, K. (1990) Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**, 9-42.
- Joshi, P.A., Caetano-Anolland, G., Graham, E.T. and Gresshoff, P.M. (1991) Ontogeny and ultrastructure of spontaneous nodules in alfalfa (*Medicago sativa*). *Protoplasma* **162**, 1-11.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. and Barker, D.G. (1994) *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the *Enod12* gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**, 241-249.
- Kape, R., Parniske, M. and Werner, D. (1991) Chemotaxis and *nod* genes activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 316-319.
- Kapp, D., Niehaus, K., Quandt, J., Müller, P. and Pühler, A. (1990) Cooperative action of *Rhizobium meliloti* nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected alfalfa nodules. *Plant Cell* **2**, 139-151.
- Kapros, T., Bögre, L., Németh, K., Bakó, L., Györgyey, J., Wu, S.C. and Dudits, D. (1992) Differential expression of histone H3 gene variants during cell cycle and somatic embryogenesis in alfalfa. *Plant Physiol.* **98**, 621-625.
- Kato, J. and Sherr, C.J. (1993) Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3, but not D1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11513-11517.
- Kiss, E., Mergaert, P., Oláh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A.E., Downie, J.A., Kondorosi, Á. and Kondorosi, É. (1998) Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, in press.
- Kiss, G.B., Csanádi, G., Kálmán, K., Káló, P. and Ókrész, L. (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 129-137.
- Kiss, G.B., Vincze, É., Kálmán, Z., Forrai, T. and Kondorosi, Á. (1979) Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 105-118.
- Kiss, G.B., Vincze, É., Végh, Z., Tóth, G. and Soós, J. (1990) Identification and cDNA cloning of a new nodule-specific gene Nms-25 (nodulin-25) of *Medicago sativa*. *Plant Mol. Biol.* **14**, 467-475.
- Klein, S., Hirsch, A.M., Smith, C.A. and Signer, E.R. (1988) Interaction of nod and exo *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**, 94-100.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. and Lehner, C.F. (1994) Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107-120.

- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. and Hunt, T. (1992) Identification of the domain in cyclin A required for the binding to, and activation of, p34^{cdc2} and p32^{cdc2} protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1279-1294.
- Kondorosi, A. (1992) Regulation of nodulation genes in Rhizobia. In *Molecular Signals in Plant-Microbe Communication*. (Verma D.P.S., eds), 325-340., CRC Press, Boca Raton.
- Kondorosi, É., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Schell, J. and Kondorosi, Á. (1991a) Identification of NodR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**, 885-896.
- Kondorosi, É., Bánfalvi, Z. and 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, É., Buiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B. and Kondorosi, Á. (1991b) Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol. Microbiol.* **5**, 3035-3048.
- Kondorosi, É., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J. and Kondorosi, Á. (1989) Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* **8**, 1331-1340.
- Kouchi, H. and Hata, S. (1993) Isolation and characterisation of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 106-119.
- Kozik, A.V., Matvienko, M.A., Men, A.E., Zalensky, A.O. and Tikhonovich, I.A. (1992) Pea (*Pisum sativum*) genes involved in symbiosis with nitrogen fixing bacteria. III. Investigation of early nodulin *ENOD12* gene structure for different varieties of pea by means of polymerase chain reaction. *Molekularnaya Biologiya* **26**, 591-595. (in Russian).
- Krause, A. and Boughton, W.J. (1992) Protein associated with root-hair deformation and nodule initiation in *Vigna unguiculata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 96-103.
- Krek, W. and Nigg, E.A. (1991) Mutation of p34^{cdc2} phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34^{cdc2} kinase activation in vertebrate. *EMBO J.* **10**, 3331-3341.
- Krey, R., Pühler, A. and Klipp, W. (1992) A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA protein. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 433-441.
- Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (1991) The *cdc25* protein controls tyrosine dephosphorylation of the *cdc2* protein in cell-free system. *Cell* **64**, 903-914.
- Kurkdjian, A.C. (1995) Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*)-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **107**, 783-790.
- Küster, H., Schröder, G., Frühling, M., Pich, U., Rieping, M., Schubert, I., Perlik, A.M. and Pühler, A. (1995) The nodule specific *VfENOD-GRP3* gene encoding a glycine-rich early nodulin is located on chromosome I of *Vicia faba* L. and is predominantly expressed in the interzone II-III of root nodules. *Plant Mol. Biol.* **28**, 405-421.
- Lauridsen, P., Franssen, H., Stougaard, J., Bisseling, T. and Marcker, K.A. (1993) Conserved regulation of the soybean early nodulin *ENOD2* gene promoter in determinate and indeterminate transgenic root nodules. *Plant J.* **3**, 483-492.
- Lee, E.M. and Harlow, E. (1993) Sequences within the conserved cyclin box of human *cyclinA* are sufficient for binding to and activation of *cdc2* kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1194-1201.
- 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.
- Leigh, J.A. and Coplin, D.L. (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 307-346.
- Leigh, J.A. and Lee, C.C. (1988) Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants that form ineffective nodules. *J. Bacteriol.* **170**, 3327-3332.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.-C. and Dénarié, J. (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Leverly, S.B., Zhan, H., Lee, C.C., Leigh, J.A. and Hakomori, S. (1991) Structural analysis of a second acidic polysaccharide of *Rhizobium meliloti* that can function in alfalfa root nodule invasion. *Carbohydr. Res.* **210**, 339-347.

- Lew, D.J., Dulic, V. and Reed, S.I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**, 1197-1206.
- Long, S.R. (1989) *Rhizobium*-legume nodulation: Life together underground. *Cell* **56**, 203-214.
- Long, S.R. (1992) Genetics analysis of *Rhizobium* nodulation. In Biological Nitrogen Fixation. (Stacey G. et al.) 560-597. New York.
- Lopez-Lara, I.M., Orgambide, G., Dazzo, F.B., Olivares, J. and Toro, N. (1995) Surface polysaccharide mutants of *Rhizobium* sp. (Acacia) strain GRH2: Major requirement of lipopolysaccharide for successful invasion of *Acacia* nodules and host range determination. *Microbiology* **141**, 573-581.
- Löbner, M. and Hirsch, A. (1993) A gene that encodes a prolin-rich protein with limited homology to *PsENOD12* is expressed in the invasion zone of *Rhizobium meliloti*-induced alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* **103**, 21-30.
- MacDonald, S.M. (1996) Histamin-releasing factors. *Curr. Op. Imm.* **8**, 778-783.
- MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J. and Lichteinstein, L.M. (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**, 688-690.
- Magyar, Z., Bakó, L., Bögre, L., dedeoglu, D., Kapros, T. and Dudits, D. (1993) Active *cdc2* genes and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.* **4**, 151-161.
- Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, É., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Koncz, C. and Dudits, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- Makela, T.P., Tassan, J.-P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371**, 254-257.
- Martinez, M.C., Jorgensen, J.-E., Lawton, M.A., Lamb, C.J. and Doerner, P.W. (1992) Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7360-7364.
- Martinez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J. 1996. *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 113-140.
- Marvel, D.J., Kuldau, G., Hirsch, A.M., Richards, E., Torrey, J.G. and Ausubel, F.M. (1985) Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a nonlegume host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5841-5845.
- Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J. and Kato, J. (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2066-2076.
- Matshushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclin during G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-713.
- Mercado-Blanco, J. and Toro, N. (1996) Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 535-545.
- Merrick, M.J. (1992) Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In Biological Nitrogen Fixation. (Stacey, G., Burris, R.H. and Evans, H.J., eds.) 835-876. New York: Chapman and Hall.
- Meskiene, I., Bögre, L., Dahl, M., Pirck, M., Ha, D.T.C., Swoboda, I., Heberle-bors, E., Ammerer, G. and Hirt, H. (1995) *cycMs3*, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* **7**, 759-771.
- Metz, E.C. and Palumbi, S.R. (1996) Positive selection and sequence rearrangements generate extensive polymorphism in the gamete recognition protein bindin. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 397-406.
- Meyerson, M. and Harlow, E. (1994) Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclinD partner. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2077-2086.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E. and Tsai, L.H. (1992) A family of human *cdc2*-related protein kinases. *EMBO J.* **11**, 2909-2917.
- Miao, G.H., Hong, Z. and Verma, D.P.S. (1993) Two functional soybean genes encoding p34^{cdc2} kinase are regulated by different plant developmental pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 943-947.
- Miller, K., Kennedy, E.P. and Reinhold, V.N. (1986) Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: Possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* **231**, 48-51.
- Moerman, M., Nap, J.P., Govers, F., Schilperoort, R., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1987) *Rhizobium nod* genes are involved in the induction of two early nodulin genes in *Vicia sativa* root nodules. *Plant Mol. Biol.* **9**, 171-179.

- Morett, E. and Buck, M. (1989) *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* *nifH* promoters: The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* **210**, 65-77.
- Morgan, D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Mulligan, J.T. and Long, S.R. (1989) A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics* **122**, 7-18.
- Munoz, J.A., Palomares, A.J. and Ratet, P. (1996) Plant genes induced in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Microbiol. Biotech.* **12**, 189-202.
- Müller, P., Hynes, M.F., Kapp, D., Niehaus, K. and Pühler, A. (1988) Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 17-26.
- Mylona, P., Pawlowski, K. and Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**, 869-885.
- Nap, J.P. and Bisseling, T. (1990) Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. In: *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. ed. Gresshoff, P.M., Boca Raton CRC Press. 181-229.
- Nasmyth, K. (1993) Control of the yeast cell cycle by the CDC28 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 166-179.
- Nevis, J.R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429.
- Newcomb, W. (1981) Nodule morphogenesis. In *International Review of Cytology*, Supplement 13. (Bourne, G.H. and Danielli, J.F., eds.) 246-298. New York: Academic Press.
- Niehaus, K. and Becker, A. (1998) The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell. Biochem.* **29**, 73-116.
- Nigg, E.A. (1993) Cellular substrates of p34^{cdc2} and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell. Biol.* **3**, 296-301.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7850-7854.
- Norbury, C. and Nurse, P.A. (1992) Animal cell cycles and their control. *Rev. Biochem.* **61**, 441-470.
- Nugent, J.H.A., Alfa, C.E., Young, T. and Hyams, J.S. (1991) Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J. Cell Sci.* **99**, 669-674.
- Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**, 961-971.
- Páy, A., Heberle-Bors, E. and Hirt, H. (1992) An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein. *Plant Mol. Biol.* **19**, 501-503.
- Papadopoulou, K., Rousis, A. and Katinakis, P. (1996) Phaseolus *ENOD40* gene is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and lateral root development. *Plant Mol. Biol.* **30**, 403-417.
- Parnishke, M., Schmidt, P.E., Kosch, K. and Müller, P. (1994) Plant defence response of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 631-638.
- Peng, T. and Dickstein, R. (1994) Regulation of plant nodule-specific genes expressed in alfalfa nodules at an early stage of development. *Plant Sci.* **101**, 65-73.
- Penmetta, R.V. and Cook, D.R. (1997) A legume ethylene insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* **275**, 527-530.
- Petrovics, Gy., Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W. and Kondorosi, Á. (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.
- Peters, N.K. and Verma, D.P.S. (1990) Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 4-8.
- Peters, N.K., Frost, J.W. and Long, S.R. (1986) A plant flavone, luteolin, induce expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**, 977-980.

- Pichon, M., Journet, E.P., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. and Barker D.J. (1992) *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* **4**, 1199-1211.
- Pines, J. (1994) Protein kinases and cell cycle controll. *Sem. Cell Biol.* **5**, 399-408.
- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: A biochemical view. *Biochem. J.* **308**, 697-711.
- Pingret, J.L., Journet, E.P. and Barker, D.G. (1998) *Rhizobium* Nod factor signaling: Evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* **10**, 659-671.
- Poon, R.Y.C., Yamashita, K., Adaczewski, J., Hunt, T. and Shuttleworth, J. (1993) The *cdc2*-related protein p40^{M^o15} is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33^{cdk2} and p34^{cdk2}. *EMBO J.* **12**, 3123-3132.
- Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Dénarié, J., Promé, J.-C. and Broughton, W.J. (1992) Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**, 3575-3584.
- Putnoky, P., Petrovics, Gy., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, C.D.T., Bánfalvi, Z. and Kondorosi, Á. (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol.* **172**, 5450-5458.
- Putnoky, P.E., Grosskopf, E., Ha, D.T.C., Kiss, G.B. and Kondorosi, Á. (1988) *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. *J. Cell Biol.* **106**, 597-607.
- Rechsteiner, M. (1988) Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of PEST region. *Adv. Enzyme Regul.* **27**, 135-151.
- Renaudin, J.-P., Colasanti, J., Rime, H., Yuan, Z. and Sundaresan, V. (1994) Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mytotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7375-7379.
- Renaudin, J.-P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V. and Murray, J.A.H. (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-10018.
- Renaudin, J.-P., Saviouré, A., Philippe, H., van Montagu, M., Inzé, D. and Rouzé, P. (1997) Characterization and classification of plant cyclins sequences related to A- and B-type cyclins. In: Plant Cell Division, Francis D., Dudits, D., Inzé D. (eds). Portland Press, London.
- Reuhs, B.L., Carlson, R.W. and Kim, J.S. (1993) *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic-acid containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K-antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 3570-3580.
- Robertson, J.G., Lyttleton, P., Bullivant, S. and Grayston, G.F. (1978) Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid mebranes. *J. Cell Sci.* **30**, 129-149.
- Robertson, J.G., Wartburton, M.P. and Farnden, K.J. (1975) Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. *FEBS Lett.* **55**, 33-37.
- Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J. and Prome, J.C. (1991b) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharid signals. *Cell* **67**, 1131-1143.
- Roche, P., Lerouge, P., Ponthus, C. and Prome, J.C. (1991a) Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Biol. Chem.* **266**, 10933-10940.
- Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debellé, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.-C. and Dénarié, J. (1996) The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15305-15310.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Rossen, L., Shearmas, C.A., Johnston, A.W.B. and 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.* **4**, 3369-3374.

- Rostás, K., Kondorosi, É., Horváth, B., Simoncsits, A. and Kondorosi, Á. (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1757-1761.
- Russa, R., Bruneteau, M., Shashkov, A.S., Urbanic Sypniewska, T. and Mayer, H. (1996) Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its non-nodulating mutant WL113. *Arch. Microbiol.* **165**, 26-33.
- Russinova, E., Slater, A., Atanasov, A.I. and Elliot, M.C. (1995) Cloning novel alfalfa cyclin sequences-a RACE-PCR approach. *Cell. Mol. Biol.* **41**, 703-714.
- Sandal, N.N., Bojsen, K. and Marcker, K.A. (1987) A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1507-1519.
- Savouré, A., Fehér, A., Kaló, P., Petrovics, Gy., Csanádi, Gy., Szécsi, J., Kiss, Gy.B., Brown, S., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (1995) Isolation of a full-length mitotic cyclin cDNA clone *CycMslII* from *Medicago sativa*: Chromosomal mapping and expression. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1059-1070.
- Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators, *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 597-626.
- Schenk, R.U. and Hildenbrandt, A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **29**, 199-204.
- 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. and Bisseling, T. (1990a) The *ENOD12* gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* **60**, 281-294.
- Scheres, B., Van Engelen, F., Van der Knaap, E., Van de Wiel, C., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1990b) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**, 687-700.
- Schmidt, J., Wingender, R., John, M., Wieneke, U. and Schell, J. (1988) *Rhizobium meliloti* *nodA* and *nodB* genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8578-8582.
- Schröder, G., Fruhling, M., Pühler, A. and Perlick, A.M. (1997) The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.* **33**, 113-123.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A. and Kondorosi, É. (1998) Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: The Rhizobiaceae. Molecular Biology of model plant-associated bacteria. Eds. Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. Kluwer Acad. Publish., 361-386.
- Schultze, M., Kondorosi, É., Ratet, P., Buiré, M. and Kondorosi, Á. (1994) Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interaction. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 1-75.
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, É., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D. and Kondorosi, Á. (1992) *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 192-196.
- Sherr, J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065.
- Showalter, A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H. and Murray, J.A.H. (1995) A family of cyclin D homologs from plant differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Soupene, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. and Batut, J. (1995) Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 359-3763.
- Spaink, H.P. (1992) Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol. Biol.* **20**, 977-986.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H. and Lugtenberg, B.J.J. (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**, 337-340.
- Stacey, G., So, J.S., Roth, L.E., Lakshmi, S.B. and Carlson, R.W. (1991) Lipooligosaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 332-340.
- Stockermans, T.J.W. and Peters, N.K. (1994) *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signal induce complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* **193**, 413-420.

- Strittmatter, G., Chia, T.F., Trinh, T.H., Katagiri, F., Kuhlemeier C. and Chua, N.H. (1989) Characterization of nodule specific cDNA clones from *Sesbania rostrata* and expression of the corresponding genes during the initial stage of stem nodules and root nodules formation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**, 122-127.
- Sullivan, D., Brisson, N., Goodchild, B., Verma, D.P.S. and Thomas, D.Y. (1981) Molecular cloning and organization of two leghaemoglobin genomic sequences of soybean. *Nature* **289**, 516-518.
- Szczyglowski, K. and Legocki, A.B. (1990) Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone encoding nodule-specific (hydroxy)proline-rich protein ENOD2 from yellow lupin. *Plant Mol. Biol.* **19**, 361-363.
- Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M. (1987) Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* **169**, 1423-1432.
- Thummler, F. and Verma, D.S.P. (1987) Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**, 14730-14736.
- Truchet, G., Barker, D.G., Camut, S., De Billy, F., Vasse, J. and Huguet, T. (1989) Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 65-68.
- Truchet, G., Poche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C. and Dénarié, J. (1991) Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**, 670-673.
- Tyers, M., Tokiwa, G. and Futcher, B. (1993) Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: *Clb3* may be an upstream activator of CLN1, CLN2 and other cyclins. *EMBO J.* **12**, 1955-1968.
- van Berkum, P., and Eardly, B.D. 1998. Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae. In: The Rhizobiaceae. Eds. Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J. Kluwer Academic Publish.
- Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J. and Kijne, J.W. (1992) Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**, 70-71.
- Van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H. and Bisseling, T. (1996) Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* **273**, 370-373.
- Van de Wiel, C., Norris, J.H., Bochenek, B., Dickstein, R., Bisseling, T. and Hirsch, A.M. (1990b) Nodulin gene expression and *ENOD2* localization in effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. *Plant Cell* **2**, 1009-1017.
- Van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., Van Lierop, M.J., Van Lammeren, A., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1990a) The early nodulin transcript *Enod2* is located in the nodule parenchyma (innert cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* **9**, 1-7.
- Van den Heuvel, S. and Harlow, E. (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- Van Kammen, A. (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2**, 43-45.
- Van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**, 124-142.
- Verma, D.P.S. and Delauney, A.J. (1988) Root nodule symbiosis: Nodulins and nodulin genes. In: *Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. eds. Verma P.D.S. and Goldberg, R.B., Springer Verlag (New York). 169-199.
- Verma, D. and Long, S.R. (1983) Molecular biology of *Rhizobium*-plant symbiosis. In *Intracellular Symbiosis*. (Jeon K. eds.), 211-245. New York: Academic Press.
- Vijn, I., Christiansen, H., Lauridsen, P., Kardailsky, I., Quandt, H.-J., Broer, I., Drenth, J., Jensen, E.O., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1995a) A 200bp region of the pea *ENOD12* promoter is sufficient for nodule-specific and Nod factor induced expression. *Plant Mol. Biol.* **28**, 1103-1110.
- Vijn, I., das Neves, A., van Kammen, H., Franssen, T. and Bisseling, T. (1993) Nod factors and nodulation in plants. *Science* **260**, 1764-1765.

- Vijn, I., Yang, W.C., Jensen, E. O., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1995b) *VsENOD5*, *VsENOD12* and *VsENOD40* expression during *Rhizobium*-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. *Plant Mol. Biol.* **28**, 1111-1119.
- Virts, E.L., Stanfield, S.W., Helenski, D.R. and Ditta, G.S. (1988) Common regulatory elements control symbiotic and microaerobic induction of *nifA* in *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3062-3065.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and the cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Wilson, R.C., Long, F., Marouka, E.M. and Cooper, J.B. (1994) A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* **6**, 1265-1275.
- Wiman, K.G. (1993) The retinoblastoma gene: Role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* **7**, 841-845.
- Witty, J.F., Skot, L. and Revsbech, N.P. (1987) Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules in O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* **38**, 1129-1140.
- Wood, S.M. and Newcomb, W. (1989) Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Bot.* **67**, 3108-3122.
- Wycoff, K.L., Hunt, S., Gonzales, M.B., VandenBosch, K.A., Layzell, D.B. and Hirsch, A.M. (1998) Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* **117**, 385-395.
- Xiong, Y., Connolly, T., Fletcher, B. and Beach, D. (1991) Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691-699.
- Yang, C. (1992) Ultrastructure of infection mode of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutant in alfalfa. *Acta Microbiol. Sin.* **32**, 191-197.
- Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H. and Bisseling, T. (1994) *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **6**, 1415-1426.
- Yang, W.C., Katinakis, P., Hendriks, P., Smolders, A., De Vries, F., Spee, J., Van Kammen, A., Bisseling, T. and Franssen, H. (1993) Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* **3**, 573-585.
- Zaat, S.A.J., Van Brussel, A.A.N., Tak, T., Pees, E. and Lugtemberg, B.J.J. (1987) Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *J. Bacteriol.* **169**, 3388-3391.
- Zevenhuizen, L.P. and Faleschini, P. (1991) Effect of the concentration of sodium chloride in the medium on the relative proportions of poly- and oligo-saccharides excreted by *Rhizobium meliloti* strain YE-2SL. *Carbohydr. Res.* **209**, 203-209.
- Zhan, H.J., Lee, C.C. and Leigh, J.A. (1991) Induction of the second exopolysaccharide (EPS₂) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3055-3059.
- Zheng, X.F. and Ruderman, J.V. (1993) Functional analysis of the P box, a domain in *cyclinB* required for the activation of Cdc25. *Cell* **75**, 155-164.