Új *Medicago truncatula* szimbiotikus gének azonosítása és jellemzése és az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízise

PhD értekezés

Kovács Szilárd

SZTE Biológia Doktori Iskola

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet

Témavezetők:

Dr. Kaló Péter, tudományos főmunkatárs

Dr. Endre Gabriella, tudományos főmunkatárs

SZTE TTIK
2022
Szeged

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék 3
Rövidítések jegyzéke 5
2. Irodalmi áttekintés 8
2.1. A nitrogén, mint fejlődést korlátozó makroelem 8
2.2. A nitrogénkötő szimbiózis evolúciós vonatkozásai 9
2.3. *Medicago truncatula*, mint modellorganizmus 9
2.4. A nitrogénkötő endoszimbiózis kialakulása 10
2.4.1. A szimbiotikus nitrogénkötés fejlődésbiológiai vonatkozásai 10
2.4.2. A szimbiotikus nitrogénkötést irányító növényi gének 16
2.5. A nitrogénkötő szimbiózis genetikai vizsgálata szimbiotikus mutánsok analízisével 31
3. Célkitűzések 32
4. Anyagok és módszerek 34
4.1. Növényi anyagok és módszerek 34
4.1.1. Növényi anyagok 34
4.1.2. A magok csíráztatása 35
4.1.3. A növények nevelése 35
4.1.4. A növények fertőzése rhizóbium baktériummal, szimbiotikus teszt 36
4.1.5. A növények inkubálása NF tartalmú extraktummal 36
4.2. Mikroszkópos vizsgálatok 37
4.2.1. *M. truncatula* gyökerek, gümők előkészítése és metszése 37
4.2.2. Alkalmazott hisztokémiai festések 37
4.3. Molekuláris biológiai módszerek 39
4.3.1. Növényi DNS tisztítás 39
4.3.2. Polimeráz láncreakció 39
4.3.3. Klónozások 40
4.3.4. Felhasznált baktériumtörzsek 42
4.3.5. Baktérium transzformálási módszerek 43
4.3.6. Növény transzformálási módszerek 43
4.3.7. Élesztő transzformálás 44
4.3.8. β-Galaktozidáz enzimaktivitás mérés és western-blot analízis 45
4.4. Felhasznált oldatok összetétele 47
4.5. Statisztikai módszerek 50
5. Eredmények 51

5.1. Szimbiotikus növényi mutánsok azonosítása 51
5.2. Az *IEF* gén azonosítása és funkcionális analízise 55
5.2.1. Az *ief-1* mutáns részletes jellemzése 55
5.2.2. Az *IEF* gén azonosítása és az *ief-1* mutáns genetikai komplementációja 60
5.2.3. Az IEF fehérje doménszerkezetének, rokonsági viszonyainak és lokalizációjának vizsgálata 63
5.2.4. Az *IEF* gén expressziójának vizsgálata 67
5.2.5. Az *IEF* gén funkciójának vizsgálata az NF szignálútban 70
5.2.6. Az IEF fehérje interakciós partnereinek keresése 74
5.3. A *NAD1* gén két új alléljának azonosítása és jellemzése 76
5.3.1. A *nad1-3* és *nad1-4* mutánsok jellemzése 77
5.3.2. A *nad1-3* és *nad1-4* mutánsok funkcionális komplementációja 80
5.3.3. A *NAD1* génexpressziójának vizsgálata 82
5.3.3. A NAD1 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata 83
5.4. Az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízise 84
5.4.1. Az NF-FN9199 mutáns vonal genetikai komplementációja 84
5.4.2. Az *nsp2-3* és *nsp2-6* pontmutánsok összehasonlító fenotipikus jellemzése 88
5.4.3. Az NSP2 E232K és D244H aminosavcserék hatása az NF szignalizációs útvonalra és a gümőfejlődésre 90
5.4.4. Az NSP2 D244H mutációja (*nsp2-6*) a VHIID motívumban esszenciális az NSP1-NSP2 jelátviteli modul kialkulásához 93
5.4.5. Az *nsp2-3* mutáns törzsspecifikus fenotípusa 96
5.4.6. Az NSP2 fehérje E232K mutációja befolyásolja a gümő inváziójá 100
6. Eredmények megvitatása 103
6.1. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakítására képtelen új mutánsok azonosítása 103
6.2. Az új *IEF* gén azonosítása és funkcionális analízise 103
6.3. A *NAD1* két új álléljának azonosítása és jellemzése 109
6.4. Az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízise 110
Köszönetnyilvánítás 114
Mellékletek 115
Summary 124
Összefoglalás 127
Irodalomjegyzék 130

Rövidítések jegyzéke

ARPC3 – **A**ctin **r**elated **p**rotein **c**omplex **3** protein

BiFC – **Bi**molecular **f**luorescence **c**omplementation

CBS1 – **C**ystathionine-**β**-**S**ynthase-like Domain **1** protein

CCamK – **C**alcium- and **ca**l**m**odulin-dependent protein **k**inase

Cm – Kloramfenikol

CNGC15 – **C**yclic **n**ucleotide **g**ated **c**hannel **15** protein

CRE1 – **C**itokinin **re**ceptor **1** protein

CTAB – **C**e**t**il-dimetil-etil-**a**mmónium-**b**romid

CYC- boksz – Palin-drome as essential *cis* element (**Cyc**lops felismerő) konzervált DNS

cYFP – **Y**ellow **f**luorescent **p**rotein **C**-terminális részlete

DELLA – Aspartic acid–glutamic acid–leucine–leucine–alanine, GRAS type transcription factor

DMI1/DMI2 (NORK)/DMI3 – **D**oes not **m**ake **i**nfection **1/2/3** protein

DNS – **D**ezoxiribo**n**uklein**s**av

dpi – (**d**ay **p**ost **i**noculation) fertőzést követő nap

DsRED – Red fluorescent protein

EDTA – **E**tilén-**d**iamin-**t**etraecetsav

EMS – **E**til-**m**etán-**s**zulfonát

***ENOD11* –** (**e**arly **nod**ulin) korai nodulin **11** gén

EPR3 – **E**xo**p**olysaccharide **r**eceptor **3** protein

ERN1 – **ER**F (**E**thylene-responsive transcription factor) required for **n**odulation **1** protein

Fix – Nitrogen **fix**ation

GAI – **G**IBBERELLININSENSITIVE

GFP – **G**reen **f**luorescent **p**rotein

GUS – Beta Glucuronidase protein

HMGR – 3-**h**ydroxy-3-**m**ethyl**g**lutaryl coenzyme a **r**eductase 1 protein

IEF – **I**nfection-related **E**pidermal **F**actor

IPD3 – **I**nteracting **p**rotein of **D**MI**3** protein

IPN2 – **I**nteracting **p**rotein of **N**SP**2**

kb - Kilo**b**ázis

kDa – **K**ilo**Da**lton

KNOX – Homeobox transcription factor

LacZ – Beta-galactosidase

LB – **L**uria-**B**ertani medium

LHK1 – **L**otus **h**istidine **k**inase **1** protein

LIN – **L**umpy **in**fection protein

Lj – *Lotus japonicus*

LNP – **L**ectin **n**ucleotide **p**hosphohydrolase protein

LRR – **L**eucine-**r**ich **r**epeat domain

LYK3/10 – LysM domain receptor-like **k**inase **3/10** protein

LysM – **Lys**in **m**otif domain

mbp – **M**ega**b**ázis **p**ár, 10^6 bázispár

MCA8 – Type IIA calcium ATPase protein

MERE1 – **Me**dicago **Re**troElement**1**

MES – 4-**M**orpholine**e**thane**s**ulfonic acid monohydrate

mg, µg – Milligramm, mikrogramm

ml, µl – Milliliter, mikroliter

mm, µm, nm – Milliméter, mikrométer, nanométer

mM, µM, pM – Milli- (10^{-3}), micro- (10^{-6}) és piko (10^{12}) moláris koncentráció

Mt – *Medicago truncatula*

N, N_2, NH_3, NO_2^-, NO_3^- - Nitrogén, dinitrogén, ammónia, nitrit,nitrát

NAD1 – Nodules with **A**ctivated **D**efense **1** protein

NAP1 – **N**ck-**a**ssociated **p**rotein **1**

NFP – **N**od **f**actor **p**erception protein

NFR1/NFR5 – Rhizobial LCO (**N**od **f**aktor) **r**eceptor **1** és **5** protein

NF-YA1/2 – **N**uclear **f**actor **Y**, subunit **A1/2** protein

NIN – **N**odule **in**ception protein

nod – Nodulation, gümőképzési, nodulációs

Nod faktor, NF – **Nod**ulation **F**aktor

NodD – **Nod**ulation Protein **D**

NOOT – **No**dule ro**ot** protein

NORK – **No**dulation **r**eceptor **k**inase protein

NPL – **N**odulation **p**ectate **l**yase protein

NSP1/NSP2 – Nodulation-**s**ignaling **p**athway **1/2** protein

NUP85/133 – **Nu**cleo**p**orin **85/133** protein

nYFP – **Y**ellow **f**luorescent **p**rotein **N**-terminális részlete

OD – **O**ptikai **d**enzitás

P – **P**hoshorus, foszfor

p35S – Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter

PBS - (**P**hosphate **B**uffered **S**aline) foszfát puffer

phemA – δ-aminolaevulinic acid synthase promoter

PIR1 – 121F-specific p53 inducible RNA 1

ptrp **-** Escherichia coli tryptophan (*trp*) promoter

RGA – **r**epressor of **ga**1-3

RNS – **R**ibo**n**ukleins**s**av

ROP 6/10 - **R**h**o**-related GTPases of **p**lant **6/10** protein

RPG – **R**hizobium-directed **p**olar **g**rowth protein

rpm – Percenkénti fordulatszám

RR 1/4 –**R r**egulator **1/4** protein

S. medicae **-** *Sinorhizobium (Ensifer) medicae*

SCR – **S**CARE**CR**OW

SCAR/WAVE – **S**uppressor of **cA**MP **r**eceptor defect/**WA**SP family **ve**rpolin homologous protein

SCARN – **SCAR-N**odulation protein

SDS – **S**odium **d**odecyl **s**ulfate

SYMRK – **Sym**biotic **r**eceptor **k**inase protein

TA – **T**etrazolium and **a**rabinose medium

Taq – **T**hermus **aq**uaticus mikroorganizmusból isolált DNS polimeráz

Tc – Tetraciklin

Tnt1 – Nicotiana tabacum retrotransposon cell type 1

V, kV – **V**olt, **k**ilovolt

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nitrogén, mint fejlődést korlátozó makroelem

A Föld légkörének túlnyomó többségét, mintegy 78 %-át a nitrogén (N) alkotja. Ennek ellenére a nitrogén, a foszforral (P) együtt a növények növekedését leggyakrabban korlátozó makroelem. A nitrogén, annak szerves és szervetlen formája folyamatos körforgásban van a légkör, a talaj és az élőlények között (Galloway, 2004). Az elhalt szerves anyagokból bomlás útján ammónia (NH_3) keletkezik, melyet az úgynevezett nitrifikáló mikroorganizmusok a növények által még hasznosítható nitritté (NO_2^-), illetve nitráttá (NO_3^-) alakítanak. Az így keletkező NO_3^- a denitrifikáló mikroorganizmusok által újra elemi dinitrogénné (N_2) alakul. A nitrogénkötő mikroorganizmusok a légköri nitrogént közvetlenül ammóniává képesek alakítani. Ezen felül természetes úton, kis mennyiségben villámlás és vulkanikus működés következtében jutnak még ammónia- és nitrogén oxidok a talajba. A modern mezőgazdasági termelés egyre növekvő nitrogénéhségére jelenleg egyedüli megoldást az ipari úton előállított műtrágya jelenti. Előállítása minden esetben a légköri nitrogén redukciójával történik, amihez a szügséges hidrogén gázt és energiát a nem megújuló fosszilis energiahordozókból nyerik. A növekvő emberi populáció élelemmel való ellátása egyre nagyobb mértékű mezőgazdasági tevékenységhez vezet, melynek zavartalan működéséhez egyre több műtrágyára van szükség, amely növeli az emberi társadalom jelenleg is számottevő ökológiai lábnyomát.

A légköri nitrogén természetes úton történő redukciójára csupán kevés prokarióta képes, ezt a folyamatot nevezzük biológiai nitrogénkötésnek. A légköri nitrogén ilyen módon ammóniává alakul, amely a növények számára ezután hasznosítható. A nitrogénkötésre képes mikroorganizmusok egyik csoportjába az obligát szabadon élő mikroorganizmusok tartoznak. Ezek az élőlények képesek szimbionta partner nélkül is biztosítani a nitrogén asszimilációját végző nitrogenáz enzimkomplexnek elengedhetetlen mikroaerob környezetet. Más prokariótak növényekkel laza asszociatív, vagy szoros szimbiotikus kapcsolatban képesek a légköri nitrogén redukciójára. Az előbb felsorolt módjai a biológiai nitrgénkötésnek eltérő arányban járulnak hozzá a légköri nitrogén asszimilációjához és mindegyik nélkülözhetetlen a biológiai nitrogén körforgás zavartalan működéséhez (Reed, 2011), azonban a szoros szimbiotikus kapcsolatban történő biológiai nitrogénkötés a leghatékonyabb módja a légköri nitrogén asszimilációjának.

2.2. A nitrogénkötő szimbiózis evolúciós vonatkozásai

Ellentétben a talajlakó gombákkal kialakított arbuszkuláris mikorrhiza szimbiózissal, melynek kialakulását egy időre teszik a szárazföldi növények megjelenésével (Remy et al., 1994;Heckman et al., 2001), a nitrogénkötő szimbiózis kialakítására csak a növények egy igen szűk csoportja képes. Ezen növényfajok a Fabales, Fagales, Cucurbitales és Rosales rendekből kerülnek ki (Soltis, 1999). Jelenlegi ismereteink szerint a nitrogénkötő szimbiózis körülbelül 65 millió évvel ezelőtt alakult ki először és azóta többször is megjelent a növények evolóciója során, de minden esetben az előbbi monofiletikus kládokon belül (Kistner and Parniske, 2002). Az evolúciós és molekuláris genetikai vizsgálatok alapján mára már egyértelműen kijelenthető, hogy a nitrogénkötő szimbiózis az ősi mikorrhiza szimbiózisra épült, annak elemeit felhasználva fejlődött ki. Ezt támasztják alá azok a szimbiotikus gének, melyek mindkét szimbiózis kialakulásához szükséges genetikai elemként lettek azonosítva.

2.3. *Medicago truncatula,* mint modellorganizmus

A növények életfolyamatainak vizsgálatára leggyakrabban használt modellorganizmus az *Arabidopsis thaliana* (magyarul lúdfű), azonban ez a keresztesvirágúak családjába tartozó növény alkalmatlan a szimbiotikus növény-mikróba kapcsolatok kutatására, hiszen egyik mikrobiális szimbiózis kialakítására sem képes. A mikorrhiza- és a nitrogénkötő szimbiózis tanulmányozására két modellszervezetet választottak ki, melyek közül az egyik a dolgozatomban is tárgyalt *Medicago truncatula* (Barker et al., 1990), illetve a *Lotus japonicus* (Handberg, 1992). A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának fejlődésbiológiai folyamatai a két növényben részben eltérőek, ez indokolta a két modellorganizmus bevezetését. Disszertációmban a *M. truncatula* és szimbionta partnere a *Sinorhizobium (Ensifer) medicae* között kialakuló szimbiotikus kapcsolat kialakítására fókuszálók.

A *M. truncatula* a kétszikűek osztályába (*Dicotyledonae)*, a hüvelyesek rendjébe (*Fabales*), a pillangósvirágúak családjába (*Fabaceae*) és a *Medicago* nemzetségbe tartozik. Származását tekintve Mediterráneum eredetű faj, lágyszárú, egynyári és önmegtermékenyülő növény. Külső megjelenésére jellemző a hármas levéllemez, sárga pillangósvirág, illetve csiga formában feltekeredő tüskés hüvelytermés, amely átlagosan 9 magot rejt (Moreau, 2006). A nitrogénkötés molekuláris vizsgálati modellnövényének a következő előnyös tulajdonságai alapján választották: diploid (2x16 kromoszóma állomány), relatíve kisméretű genom (kb. 500 mbp) (Bennett and Leitch, 2005), önbeporzás (ezért némileg körülményes a keresztezése), viszonylag rövid generációs idő, illetve egyes ökotípusainak jól transzformálható képessége. A molekuláris genetikai vizsgálatokat

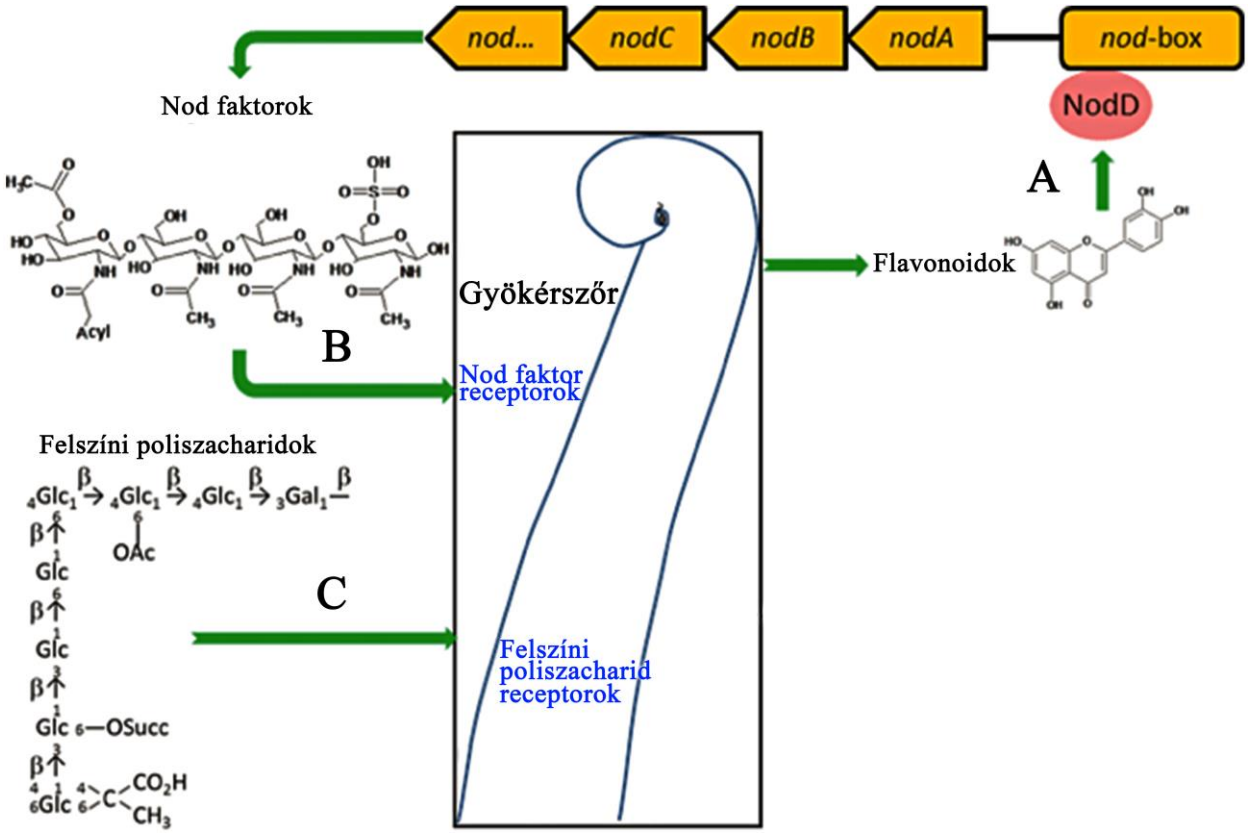
nagymértékben megkönnyíti az adott modellorganizus genomjának ismerete. Ez a *M. truncatula* esetén a Medicago Genom Program keretében, nemzetközi összefogásban készült el (http://www.medicagogenome.org/).

2.4. A nitrogénkötő endoszimbiózis kialakulása

A biológiai nitrogénkötés leghatékonyabb formája az endoszimbiózis, amely a gazdanövény gyökerén megjelenő új szervben, a gyökérgümőben történik. Ebben az új szervben, a gümősejteken belül történik a légköri nitrogén baktériumok általi redukciója a növények számára felvehető ammóniává. Cserébe a növény biztosítja a baktériumok életbenmaradásához, növekedéséhez és aktivitásához szükséges anyagcseretermékeket, illetve hozzájárul a nitrogenáz enzimkomplex működéséhez szükséges mikroaerofil környezet biztosításához. A következő fejezetben ismertetem a szimbiózis kialakulásának fejlődésbiológiai vonatkozásait, modellezem a folyamatot irányító szignálmolekulákat és jelátviteli útvonalakat.

2.4.1. A szimbiotikus nitrogénkötés fejlődésbiológiai vonatkozásai

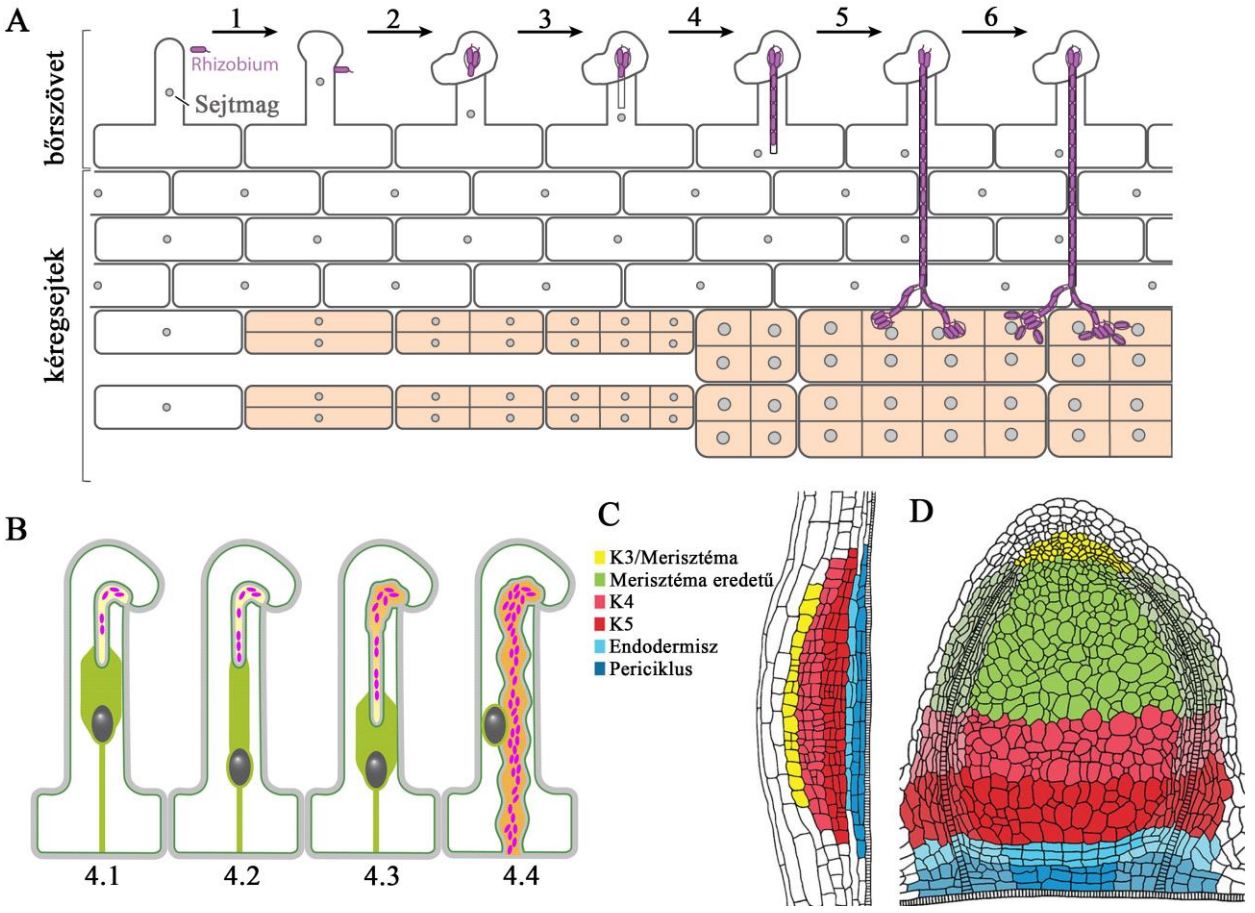
A *M. truncatula* és a talajban élő *Sinorhizobium* (*Enfiser*) *medicae* között létrejövő szimbiotikus kapcsolat első lépése a kapcsolatfelvétel, a szimbionta partnerek közötti „kommunikáció" különböző szignálmolekulák segítségével. A folyamat lépéseit a 2.1. ábra szemlélteti. Amennyiben a növény számára nincs elég felvehető formában lévő nitrogén a talajban, úgy flavonoid (*M. truncatula* esetében a legjelentősebb a luteolin) típusú vegyületeket bocsájt ki a talajba, amelyet a szimbionta partner a NodD transzkripciós faktorral érzékel, ami kiváltja annak aktiválódását is (Long, 1996) (1. ábra/A). A NodD faktor a konzervált, úgynevezett nod-box DNS szakaszhoz kötődik és indukálja a baktériumok nodulációs (*nod*) génjeinek termelődését. Ezek a *nod* gének felelősek a nodulációs faktorok (Nod faktor, röviden NF) szintetizálásáért, melyek szignálként hatnak a gazdanövény számára. Az NF egy lipochitooligoszacharid, melynek alapját 4-5 db, β-1,4-kötéssel összekapcsolt, N-acetil glükóz-aminból álló váz alkotja, melynek a nem redukáló végén lévő glükóz molekulához 16 vagy 18 szénatomszámú telítetlen zsírsavlánc kapcsolódik.



2.1. ábra. A növény és a baktérium közötti kommunikáció korai szignálmolekulái. **(A)** A növény által termelt flavonoid molekulák aktiválják a bakteriális NodD fehérjét, amely a konzervált *nod*-box régióhoz kötődve aktiválja az NF termelődéséért felelős géneket. **(B)** A baktérium által termelt Nod faktorokat a növény a gyökerén lévő felszíni receptorai segítségével érzékeli, majd a gyökérszőr olyan fokú görbüléséhez vezet, mely révén csapdába ejti a baktériumokat. **(C)** Az NF érzékelését követően a baktérium-növény közötti kommunikáció során a baktérium felszínén lévő poliszacharidoknak jelentős szerep jut az infekciós fonál fejlődésében. Az ábra Wang és munkatársai által készített ábra alapján készült (Wang et al., 2012).

Baktérium fajtól függően az N-acetil-glükózamin molekulák glikozilációja, illetve szulfát, acetil és metil csoporttal történő másodlagos módosítása is bekövetkezhet. A kitin váz és a zsírsavlánc hossza és szerkezete, valamint a másodlagos módosítások együttesen adják az NF gazdaspecificitását (Long, 1996). Az NF az első szignálmolekula, amelyet a gazdanövény érzékel különböző receptorai segítségével (2.1. ábra /B) és ez az a jelmolekula, amely beindítja a növényben azokat a változásokat, amelyek alkalmassá teszik a baktérium partner fogadására. Az NF egy rendkívül hatásos szignálmolekula, már 1 pM koncentrációban is képes specifikus növényi válaszreakciók kiváltására (Oldroyd, 2007). A szimbiózis kialakulásának későbbi szakaszában, a növény-baktérium közötti kommunikáció következő szintjét a baktérium felszínén lévő különböző összetételű felszíni poliszacharidok jelentik, melyeket ugyancsak különböző receptorok segítségével érzékel a növény (2.1. ábra /C). Ezen felszíni poliszacharidok között találunk exopoliszacharidokat (EPS), lipopoliszacharidokat (LPS), kapszuláris poliszacharidokat (KPS) és ciklikus β-glükánokat. Ezeket a felszíni poliszacharidokat különböző,

LysM és Malektin doménokat tartalmazó receptorok érzékelik. Érdemes megjegyezni még a lektinek szerepét is, amelyek bár nem esszenciálisak, hozzájárulnak a baktériumok gyökérszőrön történő megtapadásához, így elősegítik az NF-ok lokális felszabadulását és ezzel elősegítik az inváziót (van Rhijn et al., 2001;Laus et al., 2006). A növény által érzékelt NF-ok számos biokémiai, fiziológiai és morfológiai változást indítanak be a gazdanövényben, mint például a gyökérszőrön lezajló membrán depolarizáció, sejten belüli kalcium oszcilláció, illetve a gyökérszőr görbülés és a belső kéregsejtekben bekövetkező sejtosztódás (Gage, 2004), melyeket a 2.2. ábra foglal össze.



2.2. ábra. A határozatlan gümőfejlődés és növekedés folyamata (lépései). **(A)** A baktérium érzékelését követi a gyökérszőrgörbülés és az infekciós fonál növekedése a bőrszöveti sejtekben, míg ezzel párhuzamosan a belső kéregsejtekben elindul a gümőkezdemény kialakulása. A/1 a Nod faktorokat termelő rhizobium megtapadása gyökérszőrön, mely elindítja a gyökérszőr deformálódását és a kéregsejtek osztódását, A/2 gyökérszőrgörbülés folyamata, amely a baktériumok csapdázásához vezet, A/3 az előinfekciós fonál fejlődése, A/4 a fejlődő infekciósfonal (benne a baktériumokkal) eléri a bőrszöveti sejt alapját, A/5 az infekciós fonál sejtrétegről sejtrétegre halad, amíg eléri a fejlődő gümőprimordiumot, A/6 a fejlődő gümő sejtjeibe lefűződnek és membránnal határolódnak a baktériumok. **(B)** Az infekciós fonál kialakulásának és fejlődésének (A/4) részletes folyamata, ahol a zölddel a citoplazmahidak, szürke gömbbel a sejtmagok és pirossal az infekciós fonálban lévő baktériumok láthatók. A kialakuló gümőprimordium **(C)** és az érett gümő **(D)** szövetének és sejtjeinek eredete.
Az ábrák a következő publikációk alapján készültek:
A: (Cao et al., 2017), **B:** (Fournier et al., 2008), **C és D:** (Xiao et al., 2014).

A gazdanövény és a baktérium közötti „kapcsolatfelvételt” követően, a baktériumok a gyökérszőr felszínéhez tapadnak, mely végül az érintett gyökérszőr deformációjához, illetve a bőrszöveti sejt magjának a gyökérszőr felső részébe történő vándorlásához vezet (2.2. ábra A/1). A gyökérszőr elváltozását (deformáció) a tisztított NF önmagában is képes kiváltani, azonban a gyökérszőr pásztorbot szerű görbüléséhez már a partner baktériumok jelenlétére is szükség van. Az NF lokális felszabadulása, illetve a baktérium és a növényi sejtfal közvetlen kapcsolatának következtében, a gyökérszőr visszahajlik, körülöleli a sejtfalhoz tapadt baktériumokat és létrehozza a pásztorbot szerű struktúrát, mely a baktérium csapdázását jelenti és kijelöli a helyet, ahol a baktériumok belépnek a növénybe (2.2. ábra A/2). A gyökérszőrökben az első mérhető fiziológiás változások a membrán depolarizáció és a kalcium ion beáramlás, valamint az azt követő, a sejtmag körül periódikusan bekövetkező kalciumszint növekedés (kalcium oszcilláció), melyet a gyökérszőrgörbülés követ (Oldroyd and Downie, 2004). A gyökérszőrgörbülést és az epidermisz sejtben a sejtmag vándorlását aktin-citoszkeleton (Crdenas et al., 1998) és mikrotubuláris (Timmers, 1999) átrendeződések okozzák. Ezt követően a növényi sejtfal lokálisan lebontásra kerül, ehhez feltételezhetően mindkét partner hozzájárul, majd a plazmamembrán betüremkedik a gyökérszőr belsejébe, létrehozva ezzel az úgynevezett infekciós fonalat (2.2. ábra A/3), amely folyamatosan fejlődve halad a gyökérszőr alapja felé (2.2. ábra A/4). A baktériumokat tartalmazó infekciós fonál a sejten keresztülhatoló, növényi membránnal és sejtfallal is határolt csőszerű struktúra, ami topológiai szempontból kültérnek számít. Ez a folyamat részletesen a 2.2. ábra B paneljében követhető nyomon. A fejlődésnek induló infekciós fonál, a gyökérszőr felső részébe vándorolt sejtmag és az epidermisz sejt alja között kialakul egy citoplazma híd (2.2. ábra B paneljén zöld színnel jelölve) ami lehetővé teszi az infekciós fonál és a vele kapcsolatban álló sejtmag vándorlását az bőrszöveti sejt alapja felé (2.2. ábra B/1-3) (Fournier et al., 2008). A kezdeti fázisban az infekciós fonál vékony és egyenes, azonban később a benne felgyülemlő extracelluláris mátrix miatt a formája szabálytalanná válik, ebben a fázisban a sejtmag már nem a fejlődő infekciós fonál elején található, a köztük lévő kapcsolat megszűnik (2.2. ábra B/4). A baktériumok az infekciós fonálon belül találhatóak, az újrafejlődő sejtfal és sejtmembrán is elválasztja őket a növényi sejtek citoplazmájától. A baktériumok aktív mozgással, illetve osztódással töltik ki azt az űrt, amelyet a növekvő infekciós fonál hagy maga után és ily módon haladnak a bőrszöveti sejtben. Ahogy közelítik az infekciós fonalak a bőrszövet sejt határát, a következő sejtrétegben, a felső kéregsejtekben úgynevezett pre-infekciós fonalak keletkeznek (van Brussel et al., 1992;Timmers, 1999), melyeken keresztül a fejlődő infekciós fonalak tovább haladnak a belső kéregsejtek irányába. Útjuk végén elérik a belső kéregsejteket, melyek addigra osztódások sorozatával már létrehozták a gümőprimordiumot (2.2. ábra A/5 illetve részletesen később). Az infekciós fonalak ezután elágaznak és egy mélyedést

hoznak létre a növényi sejtben (2.2. ábra A/5). Ezt követően az infekciós fonálból a baktériumok növényi membránnal határolva lefűződnek a gümőprimordium sejtjeibe endocitózisszerű folyamat segítségével (2.2. ábra A/6). Ezt az úgynevezett peribakteroid membránnal határolt rhizóbiumokat tartalmazó új típusú sejtszervecskét nevezzük szimbioszómának. Ezen belül a baktériumok osztódásnak indulnak, *M. truncatula*-ban és rokonaiban terminális differenciáción mennek keresztül, mely végén bakteroidokká alakulva kezdik meg a növényi sejtekben a biológiai nitrogénkötést.

A bőrszövetben végbemenő folyamatokkal párhuzamosan a belső kéregsejtekben megindul egy másik folyamat, amely a gümő szövetének kialakulásához vezet. Ez a folyamat meglehetősen korán, már a baktériumok gyökérszőrhöz történő tapadását követően beindul (2.2. ábra A/2), amely alapján valószínűsíthető, hogy van egy olyan diffúz szignál (feltételezések szerint lehet növényi hormon, vagy maga az NF), amely a gyökérszőrből továbbítja a jelet a belső kéreg sejtek felé és elindítja a gümőképződés folyamatát. A gümőkezdemény (primordium) kialakulása némileg hasonlít az oldalgyökér fejlődéséhez, azonban míg az oldalgyökér minden esetben a periciklus sejtjeiből indul el és az elő-farész mellett kezd el fejlődni (Casimiro et al., 2003), addig a gümő képződése a belső kéregsejtek osztódásával kezdődik (Timmers, 1999) az elő-farésszel ellentétes oldalon (Gage, 2004). A gümő szöveteinek származását, illetve a kifejlett gümő szerkezetét a 2.2. ábra C és D panelje mutatja be, illetve magát a folyamatot Xiao és munkatársai írták le igen részletesen és azt az ő munkájuk alapján mutatom be (Xiao et al., 2014). A Medicago gyökere kívülről befelé a következő sejtrétegeből áll; 1 bőrsejt, 5 kéregsejt réteg (továbbiakban, mint K1-K5 hivatkozok rájuk, ahol a K1 a legfelső, bőrszövet alatti, a K5 pedig a legalsó réteg), 1 endordermisz és 1 periciklus sejt rétegből és legbelül találhatók a szállítószövetek (farész és háncsrész). A gümő kialakulásának és fejlődésének folyamatát az egyes szövetek aktiválódása (osztódási képességének visszanyerése) alapján 5 fázisra lehet osztani.

- Első fázis: Rhizóbiummal való fertőzést követően először a periciklus, majd K5 és a K4 sejtjei aktiválódnak.
- Második fázis: A K5 és K4 sejtek osztódásnak indulnak, melyet a K3 és a belső kéregsejtek aktiválódása követ.
- Harmadik fázis: A K3, periciklus és a belső bőrsejtek is osztódásnak indulnak.
- Negyedik fázis: A K3-ból eredeztethető sejtek létrehozzák a többrétegű merisztematikus szövetet, a K5-K4 eredetű sejtek létrehoznak egy körülbelül 8-10 sejtrétegnyi szövetet, míg az endodermisz és periciklus sejtjei együttesen egy körülbelül 6 sejtrétegnyi szövetet hoznak létre. A gümőfejlődés ezen fázisában, amikor a merisztéma (K3) kialakul, az alatta lévő sejtek elveszítik osztódó képességüket. Ez a fázis a 2.2. ábra A/6-os lépésének

feleltethető meg, hiszen ezek azok a (K5 és 4 eredetű) sejtek, amelyekbe lefűződnek az infekciós fonalak és végül a baktériumok.

- Ötödik fázis: Ebben a fázisban már a K3 eredetű merisztéma járul hozzá a gümő új sejtjeihez és ennél fogva mindig a gümő apikális részén foglal helyet, az általa képzett sejteket pedig folyamatosan árasztják el a baktériumok. Ebben a fázisban fejlődik ki a gümő saját szállítószövet rendszere és kialakul a teljesen fejlett gyökérgümő. Érdekes tény, hogy Medicagoban az érett gümőnek saját merisztémája van, és ezen merisztéma hozza létre a gümő szövetének jelentős többségét, de a gümő középső zónája melyet az infekciós fonalak először elérnek nem a merisztéma terméke, hanem a hajdani belső kéreg sejtek hozták azokat létre. Ez a megfigyelés azért nagyon érdekes, mert a másik modellorganizmus, a *L. japonicus* gümője nem rendelkezik saját merisztémával, annak úgynevezett determinált gümője van (a Medicago gümőjét, lévén folyamatosan növekszik, határozatlan (indeterminált) gümőtípusnak nevezték el), de a kezdeti lépésekben a két gümő fejlődése egészen a bakteriális invázióig hasonló és csak aztán tér el.

A gyökérgümő kialakulásának és szöveti struktúrájának alapján tehát a következő szövettípusokat tudjuk elkülöníteni a Medicago érett indeterminált gümőben (2.2. ábra /D): **Merisztéma (I. zóna)**, amely a gümő folyamatosan osztódó szövetét foglalja magába és baktériumokat soha nem tartalmaz; az **inváziós (II.) zóna sejtjeit**, amelyet a merisztéma hoz létre, az infekciós fonalak árasztják el és ezekben a sejtekben történik a baktériumok lefűződése; az **átmeneti (II-III. zóna)**, ahol a baktériumok nitrogénkötő bakteroidokká alakulnak, mellyel párhuzamosan a növényi sejt is megnagyobbodik; az úgynevezett **nitrogénkötő (III.) zóna**, amelyben maga a nitrogénkötés zajlik; illetve a később megjelenő **öregedési (IV.) zóna**; amely az elhalt, nitrogénkötést nem végző és lebontásnak indult sejteket tartalmazza. Az érett gümő sajátossága, hogy halvány rózsaszín színű, ami a leghemoglobin jelenlétének következménye. Feladata az oxigén megkötése és ezzel az alacsony oxigén tartalmú környezet biztosítása a gümőben, amely elengedhetetlen a nitrogenáz enzimkomplex megfelelő működéséhez.

2.4.2. A szimbiotikus nitrogénkötést irányító növényi gének

A nitrogénkötő szimbiózis fejlődésbiológiai folyamatainak tárgyalásából látszik, hogy két jól elkülöníthető útvonal zajlik egymással párhuzamosan. Az egyik a bakteriális inváziához szükséges, a gyökér felszíni bőrszövet sejtjeiben zajlik (a szövegben ezentúl epidermiális válaszként utalok rá), ezzel párhuzamosan pedig az alsó kéregsejtekben indul egy teljesen intenzív sejtosztódási folyamat, amely a gümő kialakulásához (organogeneziséhez) vezet (a szövegben ezentül kortikális válaszként utalok rá).

Az utóbbi évtizedekben több mint 30 szimbiotikus növényi gént azonosítottak, melyek az előbbiekben vázolt folyamatokat irányítják és szerepük esszenciális a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához, mellettük pedig több mint egy tucat egyéb olyan genetikai elemet, amelyek kapcsolódnak a folyamathoz (Roy et al., 2020). Mára már elfogadott tény, hogy a két teljesen eltérő fejlődésbiológiai folyamat nem csak hogy egymással párhuzamosan megy végbe, hanem az azokat irányító genetikai elemek jelentős része közös és a két folyamat egymástól függ. Bármelyikben bekövetkező hiba leállítja a másik előrehaladását. A kérdés manapság inkább az, hogy melyek azok az elemek, amelyek mind a két útvonalhoz, és melyek azok, amelyek csak a bőrszövetben lejátszódó epidermiális -, vagy csak a kéregsejtekben lejátszódó kortikális válaszhoz szükségesek.

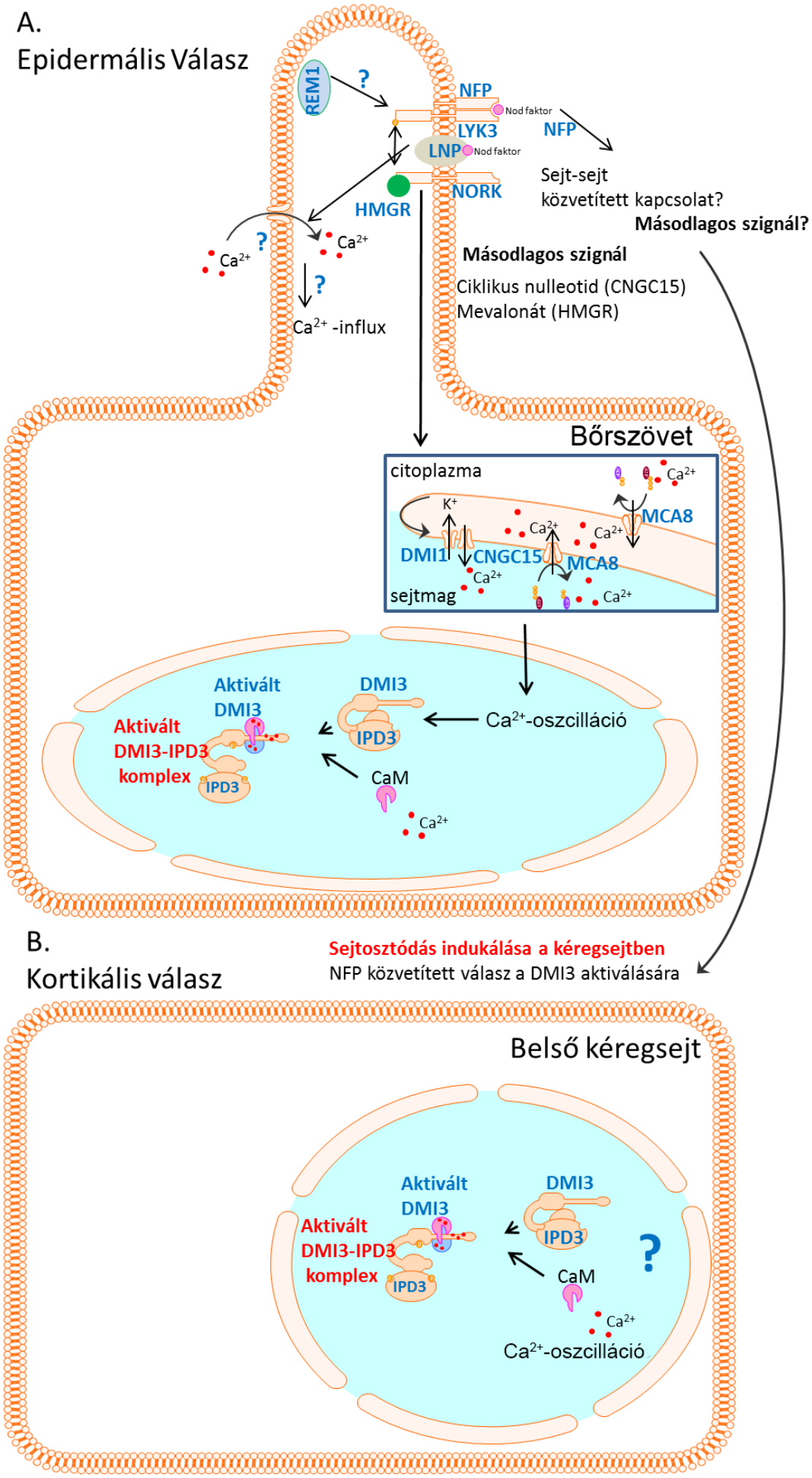
A következő fejezetben összefoglalom azokat az ismereteket, melyeket az elmúlt 20 évben szereztünk a nitrogénkötő szimbiózis növényben zajló szabályozásának kezdeti lépéseiről molekuláris szinten. A szimbiózis genetikai és funkcionális vizsgálata a már előbbiekben említett *M. truncatula* és *L. japonicus* modellnövényekhez köthető. A két modellnövényben folyó párhuzamos munkák eredményeként számos szimbiotikus gén/fehérje több elnevezést is kapott, a követhetőség kedvéért a *M. truncatula* gén és fehérje neveket előtag nélkül, míg a *L. japonicus* növényhez köthető neveket Lj előtaggal jelöltem (pl.: LjNFR1). A baktérium által termelt NF által a növényben indukált összetett válaszreakciók sorát az azt aktiváló szignálmolekula után, NF jelátviteli (szignál) útvonalnak nevezték el.

A folyamat első lépése a NF érzékelése, ezt a folyamatot a 2.3. ábra foglalja össze. A NF molekulát a gyökérszőr plazmamembránjában lévő NF receptorok érzékelik, melyek az NFP (**N**od **f**actor **p**erception)/LjNFR5 (**N**od **f**actor **r**eceptor **5**) és LYK3 (**Ly**sM domain receptor-like **k**inase **3)**/LjNFR1 (**N**od **f**actor **r**eceptor **1)** néven ismertek (Catoira et al., 2001;Limpens et al., 2003;Radutoiu et al., 2003;Arrighi et al., 2006). Ezek a LysM domént tartalmazó receptor kinázok (melyek egymással komplexet alkotnak), képesek kötni az extracelluláris doménjükön

keresztül az NF molekulát (Broghammer et al., 2012), és kizárólag a nitrogénkötő szimbiózishoz szükségesek. A két receptor közül csak a LYK3 rendelkezik funkcionális kináz doménnel, az NFP feltételezhetően a komplex kialakulásához, illetve az NF kötéséhez szükséges. Egy másik receptor kináz, az LRR (Leucin gazdag ismétlődések)-típusú receptor kinázok családjába tartozó NORK (**No**dulation **r**eceptor **k**inase)/LjSYMRK (**Sym**biotic **r**eceptor **k**inase) (Endre et al., 2002;Stracke et al., 2002). ami nem felelős közvetlenül a NF kötéséért, de szükséges ehhez a lépéshez. A NORK/LjSYMRK a közös szimbiotikus útvonal tagja, a nitrogénkötő és a mikorrhiza szimbiózishoz is szükséges. Nemrégiben kimutatták, hogy a NORK/LjSYMRK képes foszforilálni a LYK3 fehérjét (Jayaraman et al., 2017) és számos interakciós partnerét is azonosították már (Kevei et al., 2007;Zhu et al., 2008;Vernie et al., 2016;Liu et al., 2018). Ezek alapján feltételezhető, hogy a NORK komplex módon szabályozza a nitrogénkötő és a mikorrhiza szimbiózist. Egy másik fehérje a LjLNP (**L**ectin **n**ucleotide **p**hosphohydrolase) (Roberts et al., 2013) is képes kötni a NF molekulát (Etzler et al., 1999). Ez a fehérje közvetlenül a receptorok alatt helyezkedik el a közös szimbiotikus útvonalban. Ehhez a feltehetően összetett fehérje komplexhez kapcsolódik még a REMORIN1/LjREMORIN1 (Lefebvre et al., 2010;Toth et al., 2012), amely NF érzékelését követően kölcsönhat az előbb tárgyalt három receptorral és valószínűleg stabilizálja a komplexet a sejtmembránban.

Amennyire sokat tudunk az NF érzékelésével kapcsolatban, annyira hiányosak az ismereteink arról, hogy az előbb tárgyalt fehérje komplex milyen útvonalakon keresztül aktiválja a lentebb lévő elemeket. Az NFP interakciós partnereként azonosították a ROP10 (Lei et al., 2015) és a ROP6 (Ke et al., 2012) fehérjéket (**R**h**o**-related GTPases of **p**lant **6/10)**, amelyek a kis GTP-ázok családjába tartoznak. A kis GTP-ázok számos jelátviteli útvonalban töltenek be fontos szerepet (Feher and Lajko, 2015), így feltételezhető hogy ezek a fehérjék közvetítik a szignált a plazmamembrán felől. A NORK kölcsönható partnereként azonosították a HMGR (Kevei et al., 2007) fehérjét (3-**h**ydroxy-3-**m**ethyl**g**lutaryl coenzyme a **r**eductase 1), amely enzim terméke a mevalonát. A mevalonát, mint szignálmolekula is szerepet játszhat a plazmamembrán felöl jövő szignál továbbításában. Nemrégiben azonosították a CNGC15 (**C**yclic **n**ucleotide **g**ated **c**hannel **15**) (Charpentier et al., 2016), a ciklikus nukleotid kötő kalcium csatornát, melynek ligandja szintén szerepet játszik a jel továbbításában. Annyi bizonyos, hogy a plazmamembránból jövő jel a jól jellemzett kalcium választ aktiválja. Az NF érzékelését követően elsőként a kalcium ionok extracelluláris térből történő beáramlását lehet megfigyelni (Ca-influx). Eddig a LjLNP az egyetlen azonosított fehérje, ami direkten vagy indirekten szabályozza ezt a jelenséget, effektor molekulái ennek a folyamatnak nem ismertek. Ezt követően a citoplazmában a kalcium ion gyors ionkoncentrációjának változását, az úgynevezett kalcium-oszcillációt lehet megfigyelni. A sejt legnagyobb kalcium raktára a sejtmaghártyával közös endoplazmatikus retikulum és ott található

az összes eddig azonosított effektor molekula, amelyek ezt a jelenséget előidézik. Ezek a sejtmagpórusban helyet foglaló DMI1 (**D**oes not **m**ake **i**nfection **1**) és homlógjai a LjCASTOR és LjPOLLUX ioncsatornák (Ane et al., 2004;Charpentier et al., 2008), a LjNENA (Groth et al., 2010), LjNUP133 (Kanamori et al., 2006) és LjNUP85 (Saito et al., 2007) nukleoporinok (**Nu**cleo**p**orin **85/133**). Az egymással komplexet alkotó DMI1 kálium csatorna és CNGC15 (Charpentier et al., 2016) kalcium csatorna és mellettük az MCA8 (Type IIA calcium ATPase) (Capoen et al., 2011) kalcium pumpa azok az ioncsatorna fehérjék, amelyek felelősek a kalcium oszcilláció generálásáért *M. truncatula*-ban.

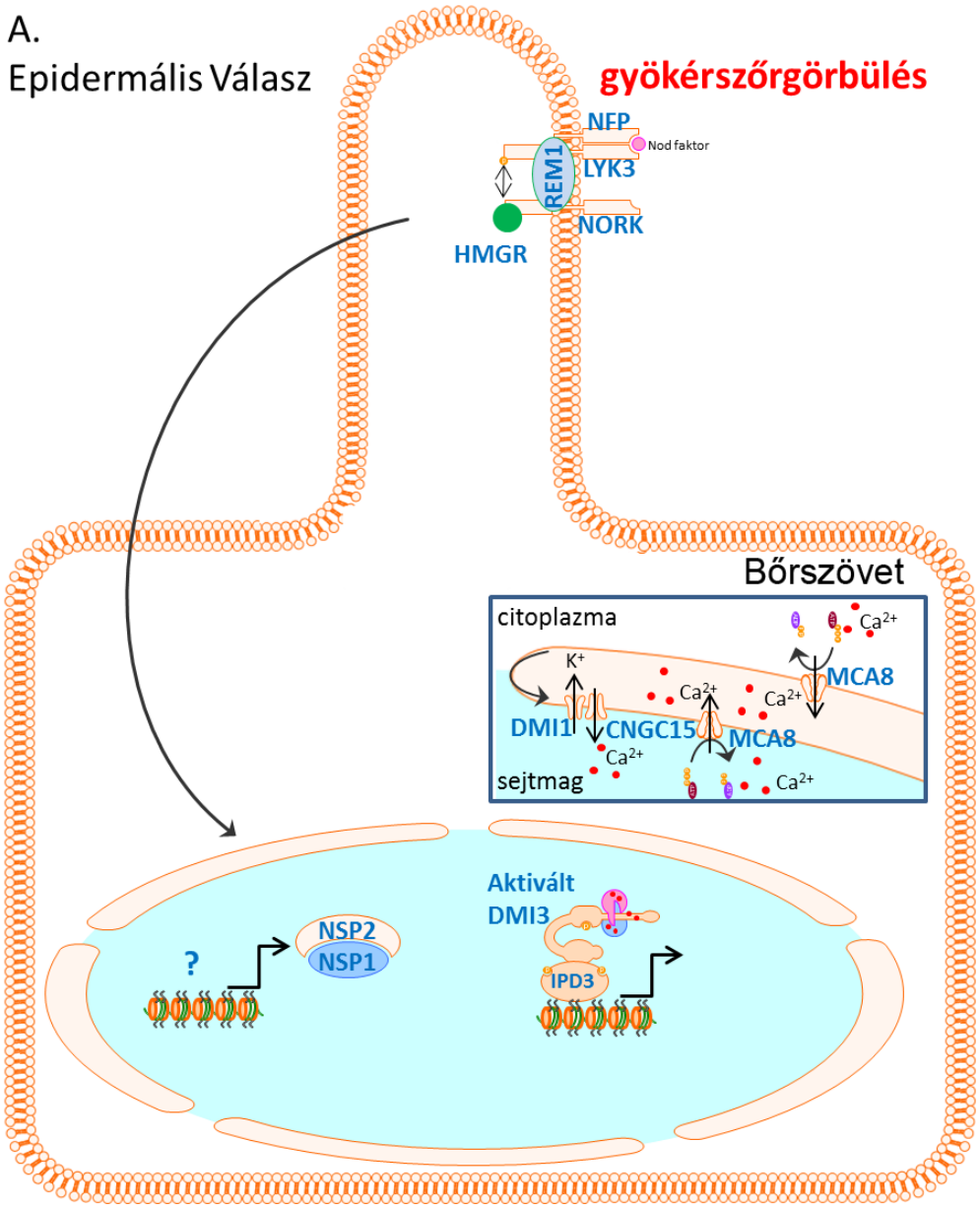

A.
Epidermális Válasz
REM1
?
NFP
Nod faktor
LYK3
LNP
Nod faktor
NFP
NORK
HMGR
Sejt-sejt
közvetített kapcsolat?
Másodlagos szignál?
Ca2+
?
Ca2+
Ca2+
?
Ca2+ -influx
Másodlagos szignál
Ciklikus nulleotid (CNGC15)
Mevalonát (HMGR)
Bőrszövet
citoplazma
Ca2+
K+
MCA8
Ca2+
Ca2+
DMI1
CNGC15
MCA8
Ca2+
sejtmag
Ca2+
Aktivált
DMI3
DMI3
Aktivált
DMI3-IPD3
komplex
IPD3
Ca2+-oszcilláció
IPD3
CaM
Ca2+
B.
Kortikális válasz
Sejtosztódás indukálása a kéregsejtben
NFP közvetített válasz a DMI3 aktiválására
Belső kéregsejt
Aktivált
DMI3
DMI3
Aktivált
DMI3-IPD3
komplex
IPD3
IPD3
?
CaM
Ca2+
Ca2+-oszcilláció

2.3. ábra. Az NF érzékelése, és a jelátviteli útvonal aktiválódása. **(A)** A bőrszöveti sejtben lejátszodó molekuláris folyamatok, melyek az aktivált DMI3/IPD3 komplex formálódásához vezetnek. **(B)** A bőrszöveti sejtből érkező nem sejt-közvetített szignál aktiválja a DMI3/IPD3 komplexet a belső kéregsejtekben (részletesen lásd a szövegben).

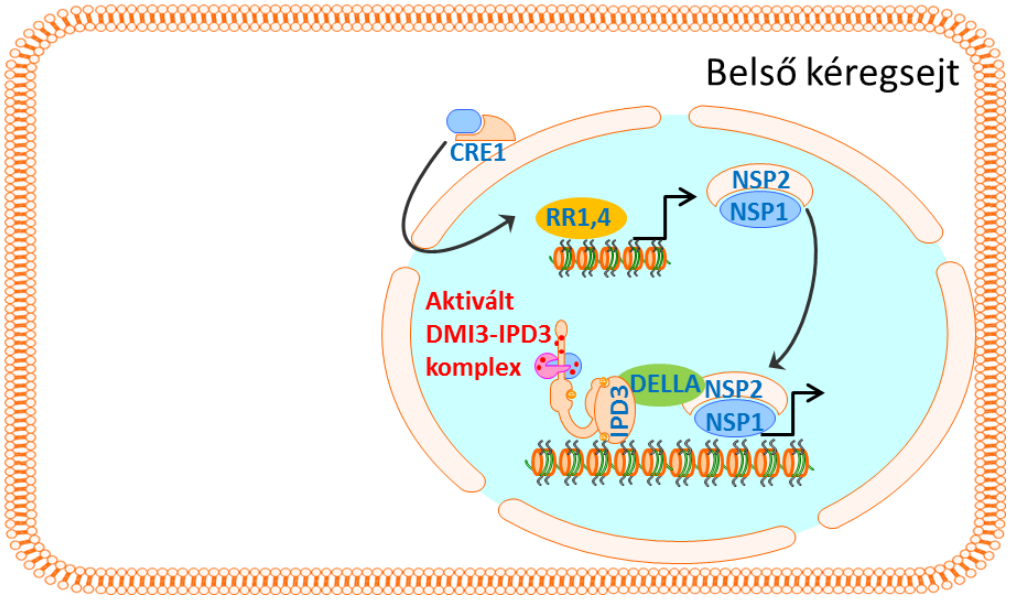
Eddigi ismereteink szerint a gyökérszőrben, az NF kötését követő kalcium oszcilláció érzékeléséért egyetlen molekula felelős, ez pedig a nitrogénkötő és arbuszkuláris szimbiózisok, azon belül is a gümőfejlődés központi szabályozója (későbbiekben mesterregulátora) ismert DMI3 (**D**oes not **m**ake **i**nfection **3**), vagy CCamK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) fehérje (Levy et al., 2004). Ez egy Ca^{2+} és kalmodulin-kötő protein kináz típusú fehérje. Alapesetben inaktív, azonban Ca^{2+} -kötést követően megnövekedett affinitást mutat a kalmodulinra, majd annak kötése után autofoszforiláció révén válik aktív kinázzá. A DMI3 az epidermális és kortikális válaszokhoz egyaránt szükséges, de egyelőre nem tudjuk, hogy milyen úton aktiválódik a belső kéregsejtekben. Egyetlen partnerét sikerült eddig azonosítani, az IPD3 (**I**nteracting **p**rotein of **D**MI**3**) /LjCYCLOPS fehérjét (Yano et al., 2008;Horvath et al., 2011). A DMI3 képes az IPD3 fehérjét négy pozícióban foszforilálni (Limpens and Bisseling, 2014;Singh et al., 2014), melyből kettő esszenciális a nitrogénkötő szimbiózishoz. Mivel a DMI3 és IPD3 fehérjék a közös szimbiotikus útvonal tagjai, így könnyen elképzelhető hogy a másik kettő pozíció a mikorrhiza szimbiózishoz szükséges. A DMI3/IPD3 komplex aktiválását követően, mint transzkripciós aktivátor komplex működik és az útvonal további elemeinek aktiválásáért felelős. A DMI3 fehérjét a gümőfejlődés központi szabályozójaként (mester-regulátoraként) is szokták jellemezni, mert a szabályozó doméneket (kalcium és kalmodulin kötő) nem tartalmazó, illetve az állandó foszforiláltsági állapotot utánzó aminosavcserés, ún. autoaktív formái képesek beindítani a gümőfejlődés programját rhizóbium távollétében is (Gleason et al., 2006a;Hayashi et al., 2010). Azonban a regulátor doméneket nem tartalmazó forma nem képes menekíteni az epidermális válaszokban fellépő hibát, tehát a regulátor domének megléte nélkülözhetetlen a DMI3 megfelelő működéséhez. Ez alapján feltételezik, hogy a DMI3 fehérjének az IPD3 mellett egyéb kölcsönható partnere(i) is lehet(nek), melyek az epidermális és kortikális válaszok közvetítéséhez kellenek. A gümőfejlődés programjának beindításához elengedhetetlen az NF érzékelése az epidermiszben. Erre közvetlen bizonyíték, hogy az NFP/LYK3 és NORK receptorok túltermelése képes beindítani a gümőfejlődési programot (Rival et al., 2012;Ried et al., 2014), sőt az NFP receptor epidermisz-specifikus promóterrel végzett komplementációja is képes aktiválni a gümőfejlődési programot a DMI3-on keresztül a kérgi sejtekben (Rival et al., 2012). Ezekből az eredményekből feltételezhető, hogy egy eddig nem ismert sejt-sejt közvetített kapcsolat aktiválja a DMI3 fehérjét a belső kéregsejtekben a korai epidermális válaszokkal párhuzamosan.

A szignál útvonal eddig tárgyalt elemei folyamatosan készen állnak az NF molekula érzékelésére, feladatuk a szignálút későbbi elemeinek aktiválása. A fentebb említett gének bármelyikének hiányában nem történnek meg a baktériumok kolonizációjához köthető morfológiai változások. Ezek közül kivételt kizárólag a *LYK3* képez, melynek hiányában minimális válaszreakciókat figyelhetünk meg, amely feltételezi egy másik hasonló típusú receptor működését (gyenge redundancia). Az *ipd3* mutánsokban a rhizóbium fertőzés hatására megfigyelhető minimális válaszreakciókról is kiderült, hogy funkcionális redundancia áll a hátterében (Jin et al., 2018). A 2.3. ábrán bemutatott lépéseket az NF szignál útvonal beindításának nevezzük. Ezután aktiválódnak azok az elemek, amelyek a rhizóbium baktériummal való fertőzés után először megfigyelhető fejlődésbiológiai folyamatokat irányítják, mint pl. gyökérszőrgörbülés és gümőprimordium kialakulása.

A.
Epidermális Válasz



B.
Kortikális válasz



2.4. ábra. Az NF jelátviteli útvonalban résztvevő transzkripciós aktivátor fehérjekomplexek kialakulása a bőrszövetben és a belső kéregsejtekben. **(A)** A bőrszövetben pontosan még nem tisztázott módon a DMI3/IPD3 mellett az NSP1/NSP2 komplex is aktiválódik, melyek a gyökérszőrgörbülés folyamatait szabályozzák. **(B)** A belső kéregsejtekben a CRE1 receptor révén a citokinin, míg a DELLA transzkripciós faktorokkal a gibberellin hormonális útvonal közreműködésével aktiválódnak a DMI3/IPD3 és az NSP1/NSP2 komplexek, melyek további gümőspecifikus gének aktivációja révén beindítják a gümőfejlődés folyamatát (részletesen lásd a szövegben).

A jelátviteli folyamat következő lépése azoknak a transzkripciós komplexeknek a kialakulása, amelyek irányítják és beindítják az elsőként megfigyelhető morfológiai változásokat, pl. a szimbionta baktérium érzékelését követő gyökérszőrgörbülést a bőrszövetbenben (2.4. ábra /A) és a gümőfejlődési programot a belső kéregsejtekben (2.4. ábra /B). A DMI3 és IPD3 fehérjék által létrehozott komplex, ami az IPD3 által felismert konzervált DNS szakaszhoz képes odakötődni (a CYCLOPS fehérje neve után CYC-boxnak elnevezett DNS szakasz) és az adott gén átíródását elindítani.

A másik komplex ismert tagjai az epidermális és kortikális válaszok irányításához is szükséges NSP1/LjNSP1 és NSP2/LjNSP2 fehérjék (**N**odulation-**s**ignaling **p**athway **1/2**) ((Kalo et al., 2005;Smit et al., 2005;Heckmann et al., 2006). Az *NSP1* és *NSP2* génekben mutáns növényekben a szimbiotikus interakció a korai lépéseknél elakad. Mind a két gén elengedhetetlen a pásztorbot szerű gyökérszőrgörbülés kialakulásához, emellett a kortikális sejtosztódás teljes hiánya jellemző az *nsp1* és *nsp2* mutáns növényekre (Catoira et al., 2000;Oldroyd and Long, 2003). A mutánsokban a szimbiotikus baktériumok jelenlétében csak részleges gyökérszőrgörbülést és gyökérszőr deformációt figyelhetünk meg. A két gén által kódolt fehérjék a GRAS-típusú transzkripciós faktorok családjába tartoznak. A család az első három felfedezett tagjáról kapta a nevét: GIBBERELLIN-INSENSITIVE (**G**AI), **r**epressor of **ga**1-3 (RGA) és a **S**CARE**CR**OW (SCR;) (Pysh et al., 1999). Az NSP1 és NSP2 transzkripciós faktorokra szükség van a korai nodulin gének bekapcsolásához (pl.: *MtENOD11* (**e**arly **nod**ulin **11**)), az NF által indított jel továbbításához és a gümőfejlődési program aktiválódásához is (Gleason et al., 2006b;Tirichine et al., 2007). Az NSP1 és NSP2 transzkripciós faktorok közös transzkripciós fehérjekomplexben működnek együtt (Hirsch et al., 2009). Kimutatták, hogy a két transzkripciós faktor közül csak az NSP1 képes a DNS-hez kötni, míg az NSP2-nek transzkripciós aktivátor szerepe van (Hirsch et al., 2009). Az NSP1 és NSP2 GRAS doménje tartalmaz két leucin ismétlődéseket tartalmazó (LHRI és LHRII) motívumot és három GRAS típusú transzkripciós faktorokra jellemző motívumot (VHIID, PFYRE és SAW) is (Bolle, 2004). A motívumok a konzervált pozícióban lévő aminosavak alapján lettek elnevezve. Az NSP1 és NSP2 deléciós formáinak vizsgálatával kimutatták, hogy az NSP1/NSP2 komplex kialakulásához

elengedhetetlen az NSP2 LHR1 és VHIID motívuma (Hirsch et al., 2009). Az *nsp2-3* pontmutáns egy nem konzervatív aminosavcserét eredményez a VHIID motívumban (E232K). Ezt a pontmutációt homozigóta formában hordozó növényen a nullmutánstól eltérően apró fehér gümőket lehet megfigyelni, és mint az NSP2 egy gyenge alléljaként írták le (Kalo et al., 2005). Az $NSP2^{E232K}$ fehérje csökkent transzaktivációs képességgel rendelkezik, ugyanakkor ez a mutáció az NSP1/NSP2 komplexformálódást nem befolyásolja (Hirsch et al., 2009). Az NSP1/NSP2 transzkripciós faktor komplex eddig azonosított direkt targetei között találunk szimbiotikus marker gént (*MtENOD11*), valamint olyan transzkripciós faktorok génjeit, amelyek a szimbiotikus interakció későbbi folyamatait irányítják (*NIN* (***N**odule **in**ception*) és *ERN1* (***ER**F (**E**thylene-responsive transcription factor) required for **n**odulation **1***)) (Hirsch et al., 2009). A közelmúltban az NSP2 kölcsönható partnereként azonosították a LjIPN2 fehérjét (**I**nteracting **p**rotein of **N**SP**2**) (Kang et al., 2014), azonban ennek az interakciónak a funkcionális jelentősége még nem ismert. Az *ipn2* mutáns erős fejlődésbiológiai defektust mutat, azaz az IPN2 funkciója nem csak a nitrogénkötő szimbiózisra korlátozódik. Kimutatták, hogy hasonlóan az NSP1-hez, az IPN2 is rendelkezik DNS-kötő tulajdonsággal (Xiao et al., 2020). Elképzelhető, hogy az IPN2 a nitrogénkötő szimbiozis mellett általános fejlődésbiológiai folyamatokban is szerepet játszik.

Számos információ áll rendelkezésre az NSP1/NSP2 komplex működéséről, azonban a szabályozásukról kevés adattal rendelkezünk. Az *nsp1* mutáns fenotípusát a négy kilobázis (kb) nagyságú saját (natív) promóterrel hajtott *NSP1* képes menekíteni, tehát ez a promóter szakasz tartalmazza az összes szabályozó elemet, ami az *NSP1* megfelelő expressziójához szükséges (Smit et al., 2005). Bár az *NSP1* alapaktivitása megfigyelhető a gyökérben, és a gümő apikális részében (merisztematikus zóna és az inváziós zónában), szabályozásáról (pl. arról hogyan aktiválódik, és mi a szerepe a gümőben) kevés adattal rendelkezünk. Az *NSP2* expressziója a szimbiotikus interakció kezdeti szakaszában megnő, illetve a gümőben az *NSP1*-hez hasonló expressziós mintázatot mutat, azonban a gén szabályozásáról korlátozottak az ismereteink. Eddig nem azonosították a funkcionális natív promóterét, illetve konstitutívan aktív promóterrel (p35S (Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S) promóter) csak részlegesen sikerült komplementálni a mutáns fenotípust (Kalo et al., 2005).

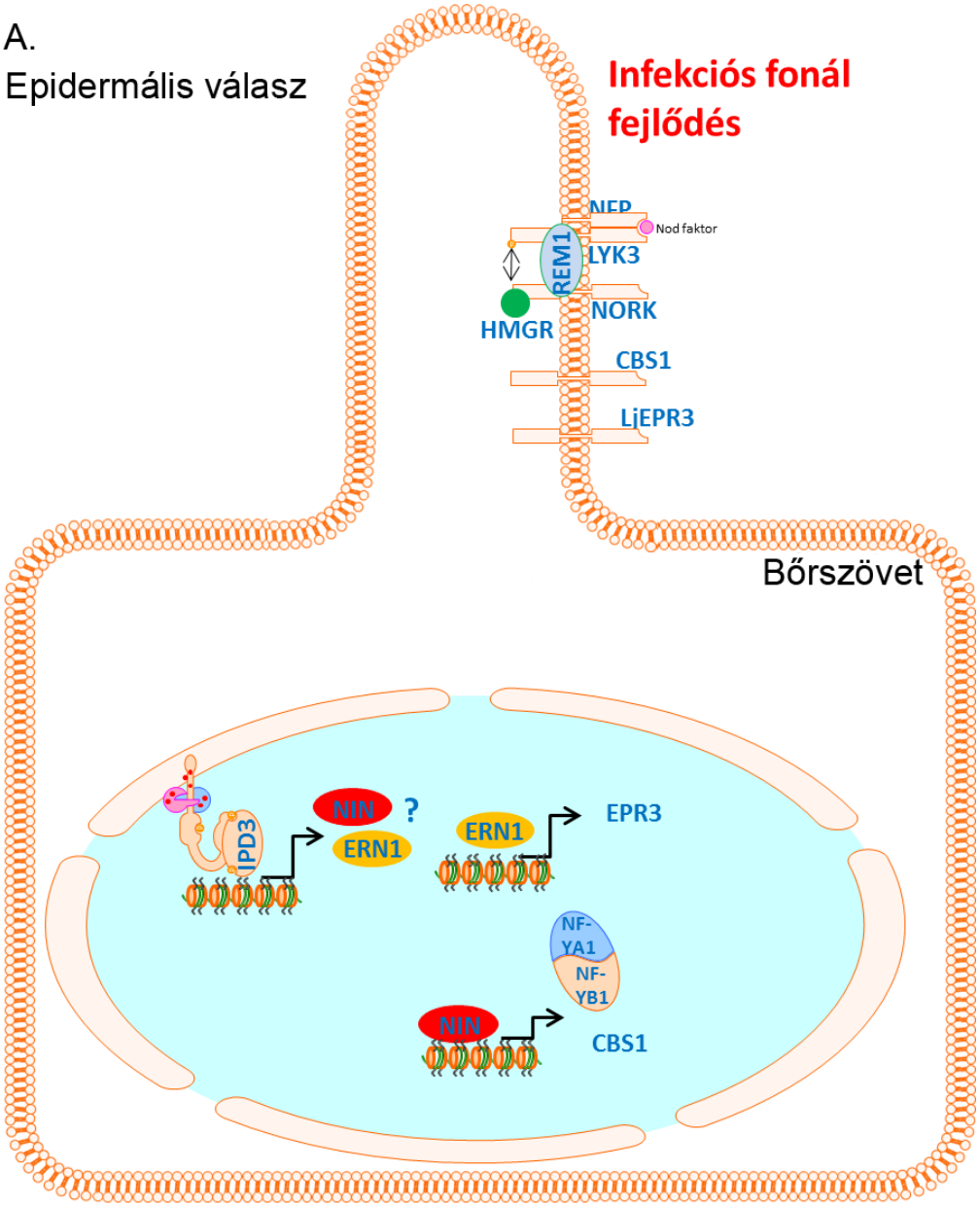
Az NSP2 transzkripciós faktor kifejeződését a kortexben a citokinin hormonális útvonal szabályozza. A citokinin bioszintézis a KNOX (Homeobox transcription factor) transzkripciós faktor által regulált (Azarakhsh et al., 2015) és a citokinin lokális felhalmozódása a CRE1 (**C**itokinin **re**ceptor **1)**/LjLHK1 (**L**otus **h**istidine **k**inase **1)** citokinin receptor aktiválódásához vezet (Gonzalez-Rizzo, 2006;Murray et al., 2007). A citokinin receptor autofoszforilációt utánzó, úgynevezett autoaktív formája a DMI3 fehérje autoaktív formájához hasonlóan képes gümőfejlődést indukálni rhizóbium mentes körülmények között (Tirichine et al., 2007). Ez

alapján kijelenthető, hogy a citokinin hormon a gümőfejlődés pozitív regulátora a nitrogénkötő szimbiózis kezdeti szakaszában. A CRE1 citokinin receptor a gümőfejlődés során az úgynevezett B típusú válasz regulátorokat aktiválja (Gonzalez-Rizzo, 2006). Kimutatták, hogy a gümőfejlődés során ezeknek a B típusú válasz regulátoroknak a közvetlen célpontja az *NSP2* (Ariel et al., 2012). Az *NSP2* promóterén azonosították a B típusú válasz regulátor (RR1) felismerő szekvenciáját, ami szükséges a szimbiotikus kölcsönhatás korai szakaszában, a formálódó gümőprimordiumban a promóter aktivitálódásához (Ariel et al., 2012). Azonban ezzel a promóter szakasszal meghajtott *NSP2* nem képes menekíteni az *nsp2* mutáns fenotípusát, annak ellenére sem, hogy a vad típusú növény kéregsejtjeiben és a gümőprimordiumában is kifejeződik (Ariel et al., 2012). Ez azt sugallja, hogy további szabályozó elemekre is szükség van az *NSP2* megfelelő szabályozásához és nem ismert még az a promóter elem, ami az *NSP2* génnek a bőrszövetben történő kifejeződését biztosítja.

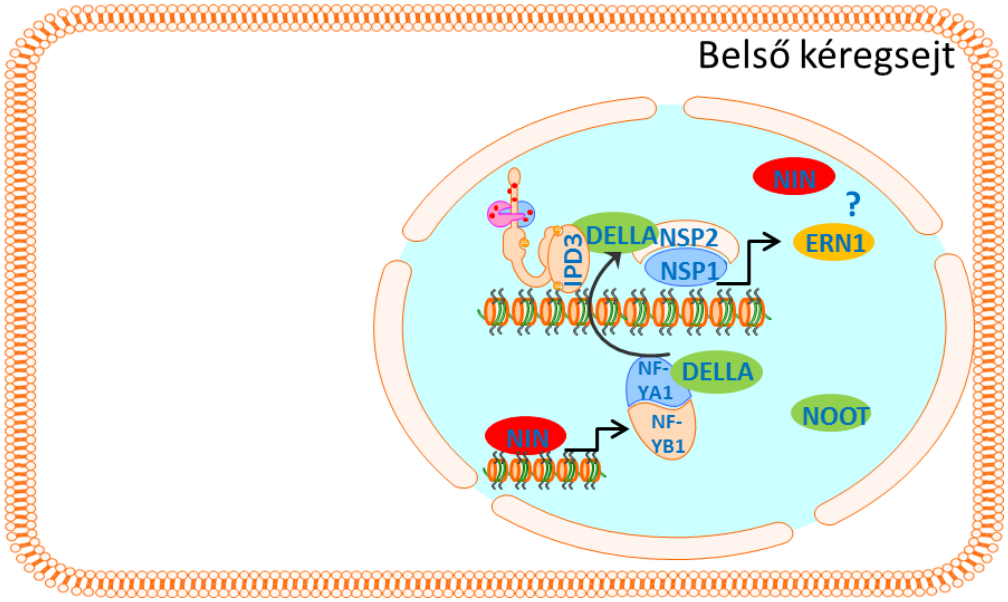
Egyértelműen kijelenthető, hogy az Az NSP1/NSP2 komplex szükséges az bőrszövetben az infekciós fonál fejlődéséhez (epidermális válasz során) és a kéregsejtben is a szimbiotikus gümő kialakulásához (kortikális válasz során). Azonban az *NSP2* kéregsejtben történő aktiválódásán kívül nincsen adat arra vonatkozólag, hogy az *NSP1* és az *NSP2* milyen módon aktiválódik az epidermális – és kortikális válasz során. További érdekes kérdés, hogy mi a kapcsolata az NSP1/NSP2 komplexnek a DMI3/IPD3 komplexszel? A kortikális válaszban, a citokinin hormonális útvonal mellett a gibberellin útvonalnak is fontos szerepe van, melynek effektor molekulái a DELLA fehérjék (Aspartic acid–glutamic acid–leucine–leucine–alanine, GRAS type transcription factor), amelyek elősegítik a DMI3/IPD3 és NSP1/NSP2 komplexek kialakulását (Jin et al., 2016;Fonouni-Farde et al., 2017).

A DELLA fehérjék jelenléte önmagában elég az IPD3 fehérje, DMI3 közvetítette aktivitásának növeléséhez, illetve emeli mindkét komplex aktivitását. Emellett a DELLA1 fehérjének DNS-kötő aktivitása is van és képes a szimbiotikus gének expessziójának beindítására (Fonouni-Farde et al., 2016), ami alapján a DELLA fehérjéket is a közös szimbiotikus útvonal tagjai közé sorolják (Floss et al., 2013). A gibberellin és citokinin útvonalak kapcsolatát tovább bonyolítja, hogy köztük szinergesztikus kapcsolat van, nem egymással párhuzamosan szabályozzák a gümőfejlődést (Fonouni-Farde et al., 2017).

A.
Epidermális válasz



B.
Kortikális válasz



2.5. ábra. Az NF jelátviteli útvonal későbbi szakaszának molekuláris szabályozási elemei. **(A)** A bőrszöveti sejtekben, illetve a **(B)** kéregsejtekben is aktiválódik az ERN1 és a NIN transzkripciós faktor, melyek felelősek az infekciós fonál **(A)** és gümőfejlődés **(B)** folyamatainak irányításához nélkülözhetetlen effektor molekulák bekapcsolásáért (részletesen lásd a szövegben).

Az előbb leírt folyamatok eredményeként kialakulnak azok a transzkripciós faktor komplexek, amelyek aktiválják a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásához szükséges géneket és folyamatokat. Ezek a genetikai elemek felelősek azoknak az effektor molekuláknak az aktiválásáért, amelyek a bőrszövetben az infekciós fonál fejlődését (2.5. ábra /A), vagy a kéregsejtekben a gümőfejlődés folyamatát irányítják (2.5. ábra /B). Eddig kettő olyan transzkripciós faktort azonosítottak, amelyeket a DMI3/IPD3 és NSP1/NSP2 komplexek aktiválnak, illetve a nitrogénkötő szimbiózishoz szükségesek (Cerri et al., 2012;Singh et al., 2014;Cerri et al., 2017). Ezek az ERN1/LjERNI (Middleton et al., 2007;Kawaharada et al., 2017a) és a NIN (Schauser et al., 1999). Ezek a transzkripciós faktorok az epidermális és kortikális válaszokat egyaránt szabályozzák több, eddig azonosított szimbiotikus gén transzkripciós aktiválása révén. Azonban mielőtt a NIN és ERN1 által szabályozott géneket részletezném, a közöttük lévő igen bonyolult kapcsolatot szeretném bemutatni. Mindkét fehérje képes egymástól függetlenül is szabályozni a különböző szimbiotikus gének kifejeződését, azonban az is kiderült, hogy a NIN közvetlenül gátolhatja az ERN1 transzkripciós aktivátor funkcióját (Vernie et al., 2015). Emellett a NIN nemcsak pozitív regulátora a nitrogénkötő szimbiózisnak, hanem a gümőképződés autoregulációjában is részt vesz (Soyano et al., 2014), amely meghatározza az ammóniát biztosító gümők optimális mennyiségét. Emellett a NIN, illetve a NIN-szerű proteineknek szerepe van a nitrát mennyiség által szabályozott gümőfejlődés gátlásában is (Lin et al., 2018). Ennek a folyamatnak a lényege, hogy amennyiben elegendő mennyiségű nitrát áll rendelkezésre a növény számára, abban az esetben a gümőfejlődés gátolódik. Egy másik érdekes eredmény a *NIN daphne* mutáns alléljához köthető (Liu, 2019b). A *daphne* mutáns segítségével azonosítottak egy távoli szabályozó elemet, melynek hiányában NIN nem képes kifejeződni a kéregsejtekben és így a kortikális sejtosztódás sem aktiválódik ebben a mutánsban. A *daphne* mutáns úgynevezett hiperinfekciós fenotípusának oka (rengeteg infekciós fonál figyelhető meg a mutánsban rhizóbium baktériummal való fertőzést követően), hogy a NIN transzkripciós faktor kizárólag az epidermiszben fejeződik ki. A *nin* és *ern1* mutánsok összehasonlító transzkriptom vizsgálatából kiderült, hogy a NIN transzkripciós faktor a szimbiotikus gének jóval nagyobb hányadát szabályozza, mint az ERN1 (Liu, 2019a). A következőkben tárgyalt szimbiotikus gének az ERN1 és NIN szabályozása alatt állnak, vagy azoktól lentebb helyezkednek el a jelátviteli útvonalban és az infekciós fonál fejlődéséhez és a gümő fejlődéséhez kellenek.

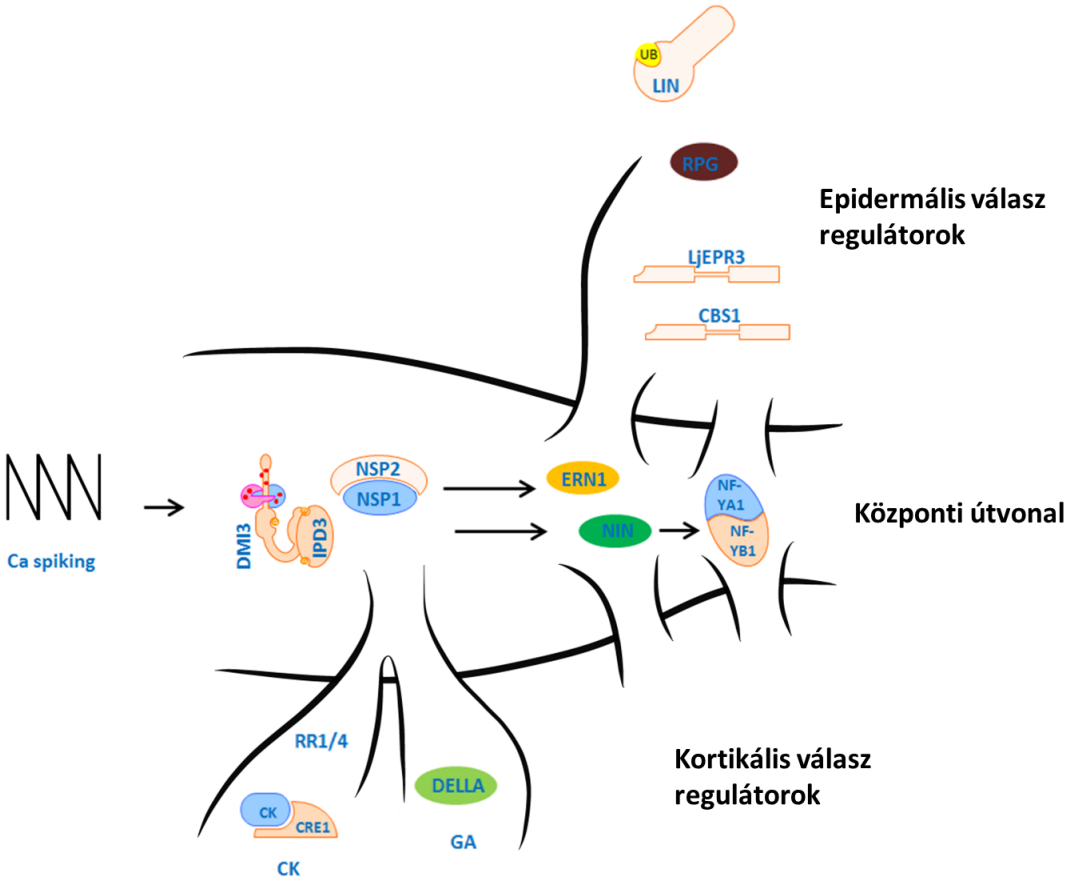
A NIN és ERN1 közötti kapcsolat vizsgálatában talán a legérdekesebb a LjEPR3 (**E**xo**p**olysaccharide **r**eceptor **3**)/LYK10 (**Ly**sM domain receptor-like **k**inase **10**), a rhizóbiumok által termelt exopoliszacharid (EPS) érzékeléséért felelős receptor (Kawaharada et al., 2015;Maillet et al., 2020). A LjEPR3, hasonlóan az NFP és LYK3 receptorokhoz, LysM ismétlődéseket tartalmazó receptor kináz, de nem az NF kötéséért, hanem sejtfelszíni poliszacharidok érzékeléséért felelős. A LjEPR3 tehát a növény-baktérium közötti kommunikáció következő szintjét szabályozza az infekciós fonál fejlődése során. A LjEPR3 az ERN1 és NIN transzkripciós faktorok szabályozása alatt áll, az ERN1 felelős az epidermisz, a NIN a kortikális specifikus aktiválásáért (Kawaharada et al., 2017b). Az NF-YA1 (**N**uclear **f**actor **Y**, subunit **A1**) transzkripciós faktor, amely a CCAAT szekvencia motívumhoz (boxhoz) kötődő transzkripciós faktorok családjába tartozik, elengedhetetlen az infekciós fonalak és a gümőprimordium fejlődéséhez (Laporte et al., 2014). Homológja (NF-YA2) vele redundáns funkciót tölt be (Laloum et al., 2014). A NIN közvetlenül szabályozza az *NF-YA1* és *YA2* kifejeződését (Soyano et al., 2013), illetve az NF-YA1 a DELLA proteinnel kölcsönhatásban szabályozza az *ERN1* expresszióját (Fonouni-Farde et al., 2016). Az NF-YA transzkripciós faktorok egyik funkciója tehát az ERN1 és NIN közötti antagonista kapcsolat kialakítása lehet. Az NF-YA1 volt az első szimbiotikus folyamatokat irányító molekula, amellyel kapcsolatba hozták a kis nem kódoló szabályozó RNS molekulákat, mint a szimbiotikus nitrogénkötés regulátorait (Combier et al., 2006;Combier et al., 2008).

Nem közvetlenül az NF szignál útvonal tagjai, de mindenképp megemlítendőek a további szimbiotikus gének, amelyek a későbbi fejlődésbiológiai folyamatokat szabályozzák. Az E3 ubiquitin ligázok családjába tartozó LIN (**L**umpy **in**fection)/LjCERBERUS (Kiss et al., 2009;Yano et al., 2009) fehérje, amely csak az epidermiális válaszok kialakításához kell, azonban ezen kívül funkciójáról nem rendelkezünk részletes ismeretekkel. Érdekessége, hogy a családjába tartozó fehérjék általában a fejlődésbiológiai folyamatok negatív regulátorai, azonban a szimbioitkus folyamatban a LIN egy pozitív regulátor. A CBS1 (**C**ystathionine-**β**-**S**ynthase-like Domain **1**) egy membrán asszociált Cystathionine béta-szintáz enzim, amely feltételezhetően a sejtfal lebontásáért felelős és így az infekciós fonál fejlődéséhez kell és expressziója a NIN-től függ (Sinharoy et al., 2016). Nem a CBS1 homológja, de a LjNPL (**N**odulation **p**ectate **l**yase) fehérje is a sejtfal lebontását irányítja (Xie et al., 2012), funkciójuk feltételezhetően hasonló. Az RPG (**R**hizobium-directed **p**olar **g**rowth) egy coiled-coiled fehérje és nélkülözhetetlen az infekciós fonál fejlődéséhez, azonban a szimbiotikus folyamatokban betöltött szerepe nem ismert. Az aktin citoszkeleton átrendeződése rendkívül fontos az infekciós fonál fejlődéséhez. A folyamatot irányító molekulákat a *L. japonicus*-hoz kapcsolódó kutatásokból ismerjük leginkább, ezek a LjSCARN (**SCAR**-**N**odulation) (Qiu et al., 2015) és LjARPC3 (**A**ctin **r**elated **p**rotein

complex **3**) (Hossain et al., 2012), illetve a LjNAP1 (**N**ck-**a**ssociated **p**rotein **1**) és LjPIR1 (121F-specific p53 inducible RNA 1) (Yokota et al., 2009) fehérjék. A LjNAP1 és LjPIR1 az aktin citoszkeleton átrendeződéséhez, illetve a gyökérszőrgörbülés folyamatához kellenek. A LjSCARN és LjARPC3 pedig a SCAR/WAVE (**S**uppressor of **cA**MP **r**eceptor defect/**WA**SP family **ve**rpolin homologous) aktin regulációs komplex tagjai. A komplex feltételezett funkciója az infekciós fonál kezdőpontjának kijelölése, a sejtfal lebontásáért (pl. NPL, CBS1) és a formálódó sejtfal és sejtmembrán szintetizálásáért felelős enzimek mikrobulus közvetítette szállítása az infekció helyéhez. A *scarn* kivételével mindegyik mutánsnak van gyökérszőr -, trichoma - és egyéb fejlődésbiológiai fenotípusa is, tehát nem csak a szimbiózis kialakításában játszanak szerepet, hanem általános a funkciójuk. Emellett érdemes megemlíteni a NOOT (**No**dule ro**ot**) fehérjét, amelynek funkciója a fejlődő gümő identitásának megőrzése (Couzigou et al., 2012), azáltal, hogy megakadályozza oldalgyökér szerű struktúrák kialakulását a fejlődő gümőn.

Az előbbiekben vázolt rendkívül bonyolult szignál útvonalat az alábbi modellen összegzem (2.6. ábra). Az egyes gének funkcionális analíziséből kitűnik, hogy van egy központi útvonal, melynek elemei egymással jól meghatározott hierarchiai viszonyban vannak és egyaránt szükségesek a kortikális és az epidermális folyamatokhoz (Ezek az IPD3/DMI3, NSP1/NSP2, NIN, ERN1 és NF-YA transzkripciós faktorok). Ezt a központi jelátviteli útvonalat egészítik ki különböző, a folyamatba bekapcsolódó utak, melynek elemei vagy csak az epidermális (LIN, RPG, LjEPR3 és CBS1), vagy csak a kortikális (CRE1 és DELLA fehérjék) válaszreakciókat szabályozzák.

A bakteriális infekció és a gümő kialakulás hátterében álló növényi gének azonosítása napjainkban is aktívan kutatott terület. Disszertációmban új szimbiotikus növényi mutánsokat azonosítottam, valamint jellemeztem a bennük elrontott szimbiotikus növényi géneket, ami hozzájárul a fent vázolt modell bővítéséhez és a szabályozás pontosításához. Emellett az *nsp2* két pontmutáns alléljának funkcionális analízisét végeztem el, amely hozzájárul az *NSP*2 gén nitrogénkötő szimbiózisban betölött szerepének pontosabb megértéshez.



2.6. ábra. Az NF szignálút molekuláris szabályozási modellje. Központi útvonal elemei, amelyek az epidermális és kortikális útvonalakat egyaránt regulálják, míg az epidermális és kortikális válasz-regulátorok azok az elemek, amelyek specifikusak valamelyik útvonalra (részletesen lásd a szövegben).

2.5. A nitrogénkötő szimbiózis genetikai vizsgálata szimbiotikus mutánsok analízisével

A fejlődésbiológiai folyamatok hátterében álló gének azonosítására legtöbbször az úgynevezett „forward" genetikai módszert alkalmazzák. Ennek során a vizsgált biológiai folyamatban hibát szenvedett mutánsok segítségével azonosítják a mutációt szenvedett gént. Az adott folyamatban mutáns növények kiválasztásához először mutánsgyűjtemény előállítására van szükség. *M. truncatula* esetén több ilyen mutánsgyűjtemény is elérhető (Tadege et al., 2009). Ezek között találunk kémiai mutagenezissel (etil-metán-szulfonát kezelés - EMS mutánsok), gyors neutron besugárzással (Rogers, 2008), vagy inszerciós mutagenenezissel (Tadege et al., 2008) előállított mutánsparkokat, mely utóbbiban a dohány eredetű *Tnt1* transzpozonon kívül (*Tnt1* -Nicotiana tabacum retrotransposon cell type 1 (Grandbastien, 1989)), endogén *MERE1* -**Me**dicago **Re**troElement**1**- (Rakocevic et al., 2009) retrotranszpozon inszerciók is vannak.

Disszertációmban *Tnt1* inszerciós mutagenezissel előállított mutánsokat mutatok be, ezzel a módszerrel kettő mutánsgyűjteményt is előállítottak. Az egyik, *M. truncatula* R108 háttérben áll rendelkezésre (Pislariu et al., 2012), mely mintegy 25000 mutánsból áll és a Samuel Roberts Noble Foundation (Egyesült Államok) kezelésében van. A másik, dolgozatomban is tárgyalt mutáns gyűjtemény, *M. truncatula* 2HA genetikai háttérben került előállításra és körülbelül 2000 különböző vonalból áll. Csak a magyarországi laboratóriumokban folyt szisztematikus tesztelés szimbiotikus mutánsok azonosítására ezen a mutánsgyűjteményen. Ennek a munkának az eredménye a dolgozatomban tárgyalt *IEF* (***I**nfection-related **E**pidermal **F**actor*) gén azonosítása (Kovacs et al., 2022) és a *NAD1* (***N**odules with **A**ctivated **D**efense **1***) gén egyik mutáns allélja (Domonkos et al., 2017), valamint egy további mutáns került kollaborációban azonosításra, mely az én munkámmal párhuzamosan került leírásra (Laffont et al., 2019).

3. Célkitűzések

Csoportunk kutatási témája a pillangósvirágú modellnövény *M. truncatula* és szimbionta partnere a *Sinorhizobium medicae* között kialakuló nitrogénkötő szimbiózis genetikai és molekuláris biológiai vizsgálata. Ennek során olyan növényi géneket próbálunk azonosítani, amelyek nélkülözhetetlenek a szimbiózis folyamatához. Munkánk során a klasszikus genetikai vizsgálatokat jelentő fenotipikus analíziseket és a legmodernebb szekvenálási módszereket használjuk.

Célul tűztük ki a *M. truncatula* európai *Tnt1* inszerciós mutáns gyűjteményben új szimbiotikus mutáns vonalak szelektálását és a bennük mutációt szenvedett szimbiotikus gének azonosítását és funkcionális analízisét. Az elvégezni kívánt munkák az alábbi fő pontokba szedhetőek:

1. Előzetes fenotípus szűrés alapján a feltételezett szimbiotikus mutáns vonalak fenotípus adatainak megerősítése, új *M. truncatula* inszerciós vonalak azonosítása.

2. Az azonosított mutáns vonalakban az inszerciós események meghatározása új-generációs szekvánálási módszerek segítségével. A mutációt szenvedett gének in silico analízisével és expressziós adatbázisok tanulmányozásával olyan jelölt gének azonosítása, amelyek mutációja feltételezhetően az adott vonalban a szimbiotikus fenotípust okozhatták.

3. A vonalak mutáns egyedeinek vad típusú növénnyel való visszakeresztezése BC/F1 hibrid és F2 szegregáló populáció előállítása céljából.

4. A szegregáló populáció egyedeiben a jelölt gének genotipizálása, a fenotípussal ko-szegregációt mutató gén azonosítása az adott vonalban. Annak bizonyítására, hogy valóban a fenotípust okozó gént azonosítottunk komplementációs kísérletek elvégzése.

5. Az általunk azonosított szimbiotikus gén(ek) funkcionális jellemzése, a szimbiózisban betölöttt szerepének a tisztázása.

Emellett célul tűztük ki a már ismert *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízisét. Az elvégezni kívánt munkák az alábbi fő pontokba szedhetőek:

1. A már azonosított, *nsp2-2* mutáns növénnyel allélikus NF-FN9199 mutáns (amely az *NSP2* gén kodoló régiójában hordoz egy pontmutációt) vonal genetikai komplementációja és ezzel egy új *nsp2* allél azonosítása.

2. A már ismert *nsp2-3* és az új allél részletes fenotípus analízise.

3. A két pontmutáns fehérje funkcionális vizsgálata. Az NSP1 fehérjével történő kölcsönhatás tesztelése.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növényi anyagok és módszerek

4.1.1. Növényi anyagok

Kísérleteink során a *M. truncatula* Jemalong ökotípusba tartozó 2HA vagy A17 jelű vad típusú növényeket használtuk. A használt *Tnt1/MERE1* inszerciós mutáns gyűjteményt 2HA vonalban állították elő az Európai Únió FP6 keretprogramja által támogatott GLIP projekten belül (Iantcheva et al., 2009), és laboratóriumunkban tartjuk fenn.

A munkánk során felhasznált, a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nélkülözhetetlen génekben mutáns növények nevét, mutációt szenvedett gén nevét, származási helyét, előállítási módját és eredetét a 4.1. táblázat foglalja össze.

mutáns	gén	mutegenezis típusa	azonosítás helye	hivatkozás
lyk3-1	*LYK3*	etil-metán-szulfonát(EMS)	University of California	Catoria et al., 2001
dmi2-1	*NORK*	etil-metán-szulfonát(EMS)	BRC-HAS, Szeged	Endre et al., 2002
nsp2-2	*NSP2*	gyors neutron sugárzás	John Innes Centre, Norwich	Kalo et al., 2005
nsp2-3	*NSP2*	etil-metán-szulfonát(EMS)	John Innes Centre,Norwich	Kalo et al., 2005
nsp2-6	*NSP2*	gyors neutron sugárzás	MBK, Gödöllő	Kovacs et al., 2021
dmi3-1	*DMI3*	etil-metán-szulfonát(EMS)	Castanet-Tolosan, France	Lévy et al., 2004
ipd3-1	*IPD3*	gyors neutron sugárzás	MBK, Gödöllő	Horváth etal., 2011
bit-1	*ERN1*	gyors neutron sugárzás	John Innes Centre	Middleton et al., 2007
nin-1	*NIN*	inszerciós mutagenezis	John Innes Centre	Marsh et al., 2007
nad1-3	*NAD1*	gyors neutron sugárzás	MBK, Gödöllő	Domonkos et al.,2017
nad1-4	*NAD1*	inszerciós mutagenezis	BRC-HAS, Szeged	Domonkos et al.,2017
ief-1	*IEF*	inszerciós mutagenezis	BRC-HAS, Szeged	Kovacs et al., 2022

4.1. táblázat: A kísérleteink során felhasznált szimbiotikus mutánsok. A mutáns neve, a mutációt szenvedett szimbiotikus gén neve, mutagnezezis típusa, a gén leírásának helye és a hivatkozás feltüntetésével.

4.1.2. A magok csíráztatása

Kísérleteink során minden esetben sterilizált magokból nevelt növényeket használtunk, a sterilizálást a Medicago kézikönyvben részletesen leírt módszer alapján végeztük el (Garcia et al., 2006). A magok felszínének megsértését 2-3 percig tartó, 96 %-os tömény kénsavval történő kezeléssel értük el, ezt követően a kénsavat eltávolítottuk és jéghideg steril desztillált vízzel többször átöblítettük a magokat. A magokat sötétben, 4 ºC-on inkubáltuk egy éjszakán át. A megduzzadt magokat 1 %-os vizes agart tartalmazó petri csészében 4 napig tároltuk sötétben, 4 ºC-on, ezzel elősegítve a szinkronizált csírázás folyamatát. A csírák kiültetése és fertőzése a különböző kísérleknek megfelelően történt a lentebb vázolt módokon.

4.1.3. A növények nevelése

A mutáns és a kontroll (vad) fenotípusú növényeket egyaránt zeolit (Geoproduct Kft., Mád, Hungary) tápanyagmentes/semleges közegben neveltük, a fertőzést követően üvegházi körülmények között. A növényeket hosszúnappalos fényviszonyok mellett (16 óra megvilágítás/8 óra sötét) neveltük, 25 ºC-on. A növények tövéhez hetente 10-20 ml nitrogénszegény Fahreus tápoldatot locsoltunk (Barker et al., 2006).

A növények nevelése minden esetben azonos körülények között történt, azonban a rhizóbiummal való fertőzés időpontja a különböző kísérleti kondíciók szerint az alábbi módon alakult: a fenotípus jellemzéshez és mikroszkópos analízishez a növényeket a kiültetésük után 7 napig rhizóbium mentes körülmények között növesztettük; a szegregáló populáció növényeinek fertőzése a kiültetéssel párhuzamosan történt; a lentebb részletesen tárgyalt módon előállított transzgenikus gyökereket fejlesztő növényeket 14-21 napig növesztettük rhizóbium mentes körülmények között.

A *Nicotiana benthamiana* növények neveléséhez a magokat tőzeg tartalmú Jiffy-re (38mm-átmérőjű tőzegkorong) ültettük és állandóan vizesen tartottuk erős megvilágítás mellett (16 óra megvilágítás/8 óra sötét). A csírázás után a növényeket volldünger tápoldattal nedvesített, tőzeg és perlit keverékét tartalmazó közegbe ültettük át. A megfelelő méretet ilyen körülmények között 6-7 hét alatt érik el a növények.

4.1.4. A növények fertőzése rhizóbium baktériummal, szimbiotikus teszt

A növények fertőzéséhez különböző baktérium törzseket használtunk (4.2. táblázat). A rhizóbium baktériumokat minden esetben TA táptalajon (1,5 % agarral kiegészített) neveltük az adott törzsnek megfelelő antibiotikum jelenlétében, 30 ºC-on. A frissen egy telepre szélesztett törzseket átkentük friss lemezre és két napig növesztettük közvetlenül a fertőzést megelőzően. A fertőzés napján a lemezről nitrogénszegény Fahreus oldatba szuszpendáltuk fel a baktériumokat. A baktérium szuszpenziókat ezután higítottuk (OD_{600}: 0,1). A növények fertőzéséhez az előbbi szuszpenzióból növényenként 5 ml-t használtunk.

Rhizóbium törzs	**antibiotikum rezisztencia(µg/ml)**	**plazmid**	**markergén**
S. medicae WSM419	Cm20	-	-
S. medicae WSM419	Cm20, Tc20	pMEGFPGUS	*ptrp::GFP-uidA*
S. medicae WSM419	Cm20, Tc20	pXLGD4	*phemA::LacZ*
S. meliloti Sm1021	Cm20, Tc20	pXLGD4	*phemA::LacZ*

4.2. táblázat: Kísérleteink során használt rhizóbium törzsek. A baktérium törzs neve, antibiotikum rezisztencia végkoncentrációja (Cm-kloramfenikol, Tc-tetraciklin), a baktériumba transzformált plazmid és az általa hordozott riportergén. Mind a *ptrp*, mind a *phemA* promóter konstitutív expressziót biztosít a zöld fluorescens fehérjét és a β-glükuronidáz, illetve a β-galaktozidáz riporter fehérjéket kódoló géneknek.

A *Tnt1* mutáns vonalak tesztelésénél a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 4. hétben vizsgáltuk a növények szimbiotikus fenotípusát. A részletes vizsgálatba vont vonalak szimbiotikus fenotípusának részletes jellemzéséhez a fertőzést követően a második naptól kezdve több időpontban is gyökér-, illetve gümő mintákat gyűjtöttünk a lentebb leírt mikroszkópos elemzésekhez.

4.1.5. A növények inkubálása NF tartalmú extraktummal

Az NF tartalmú extraktumot a *Sinorhizobium medicae* WSM419 baktériumtörzsből tisztítottuk. A rhizóbium baktérium frissen felnőtt 2-3 telepét 10 ml, 20 µg/ml Chloramphenicol (Duchefa cat. No. C0113) antibiotikummal kiegészített TA folyékony táptalajba oltottuk és egy éjszakán át növesztettük 30 ºC-on. A felnőtt kultúrát átoltottuk 500 ml friss tápoldatba és növesztettük OD_{600}: 0.5 értékig (hozzávetőleg 9 órán át). A felnőtt kultúrát jégen lehűtöttük, majd 2000 rpm-en 25 percig centrifugáltuk (Heraeus Multifuga 3L-R). A baktérium pellettet kétszer mostuk nitrogénmentes Fahreus tápoldattal. A baktériumokat felszuszpendáltuk 10 µM luteolinnal (Sigma CAS Number 491-70-30) kiegészített 500 ml nitrogénmentes Fahreus oldatban és a növesztéssel megegyező

körülények között inkubáltuk 16 órán át. Annak érdekében, hogy a bakteriumoktól megszabaduljunk a szuszpenziót 4600 rpm-en 20 percig centrifgáltuk és a felülúszót vákum mellett sterilre szűrtük (Corning Cat. No. 430320). A felülúszó baktériummentességét ellenőrizendő, 10 µl-t kikentünk szilárd TA táptalajra. Az így nyert NF tartalmú extraktumot 10 %-os higításban alkalmaztuk a rhizóbium mentes körülmények között nevelt transzgenikus növényeken, melyeket 24 óráig inkubáltuk az extraktummal. Negatív kontrollként nitrogénmentes Fahreussal inkubáltuk a növényeket.

4.2. Mikroszkópos vizsgálatok

4.2.1. *M. truncatula* gyökerek, gümők előkészítése és metszése

A levágott növényi részéket és metszeteket minden esetben 1x PBS pufferben mostuk és tároltuk. Abban az esetben, ahol a hisztokémiai festést megelőzően fixálásra volt szükség, a növényi mintákat 2,5 % os glutáraldehid (Sigma-Aldrich) vizes oldatba tettük, majd vákuminfiltráltuk 30 percen át, amit 1 óra szobahőn történő inkubálás követett. A fixálást követően 1x PBS pufferrel háromszor mostuk a mintákat és a felhasználásig 4 ºC-on tároltuk azokat.
Abban az esetben, ahol a mintákat a festéseket megelőzőleg, vagy azután metszettük, a növényi részeket 5 %-os agaróz gélbe ágyaztuk és MICROM HM 650 V mikrotóm segítségével 60-70 µm vastag szeletekre vágtuk.

4.2.2. Alkalmazott hisztokémiai festések

GUS festés

A β-glükuronidáz enzimaktivitását kék (X-GLUC), illetve magenta (Magenta-GLUC Duchefa Biochemie) színű terméket eredményező szubsztrátot tartalmazó festékoldattal tettük láthatóvá. Utóbbi szubsztrátot abban az esetben használtuk, amikor kettős GUS + LacZ festést végeztünk, mert a β-galaktozidáz aktivitás kimutatására használt X-GAL terméke is kék.
Az előzetesen metszett gümőket vagy egész gyökereket GUS festőodatban 30 percen keresztül vákum alatt kezeltük, ezután pedig 37 ºC-on inkubáltuk 1 órán át, illetve promóteranalízis esetén 4-6 órán keresztül. Ezután a metszeteket, illetve gyökereket fénymikroszkóp alatt értékeltük és dokumentáltuk. A Leica DM LB2 fénymikroszkóp 10x, 20x, illetve 40x nagyítású lencséit használtuk, a képeket pedig a QImaging MicroPublisher 3.3 RTV géppel készítettük a gyártó által ajánlott szoftver segítségével.

LacZ festés

A LacZ festés a β-galaktozidáz enzimaktivitáson alapuló festés, amelyet X-GAL szubszrátot tartalmazó festékoldattal végeztünk. A mintákat festés előtt fixáltuk a fentebb leírt módon, majd festőoldatban 30 percet vákum alatt kezeltek, majd további 30 percet 37 ºC-on inkubáltuk, a kiértékelés és dokumentálás a fentebb leírt módon történt.

GUS + LacZ kettős festés

Kettős festés esetén először GUS festés történt, amit fixálás után LacZ festés követett. A dokumentálás a fentebb leírt módon történt.

Polifenol festés

A növényi védekezési reakciók kimutatására a piros tartományban detektálható autofluoreszcencia mellett a növényi polifenolok kimutatására használt polifenol festést alkalmaztuk, melyre a publikált protokoll némileg módosított változatát használtuk (Veereshlingam et al., 2004). A gümőmetszeteket fixálás után 5 percig festettük 0,04 %-os kálium-permanganát oldatban, majd a metszeteket 3x mostuk 1x PBS-ben. Ezután 0,01 %-os metilénkék oldatban festettük 2 percig, majd 2,4 %-os Nátrium-hipokloritra cseréltük egyből a metilénkék oldatot és inkubáltuk 5 percig. Végül a metszeteket 3x5 percig mostuk 1x PBS oldatban. A kiértékelés és dokumentálás a fentebb leírtak szerint történt.

SYTO13 festés

A Syto13 festés esetén a gümőket 4% paraformaldehid oldatban vákuum infiltráltuk 3x30 másodpercig, majd 30 percig jégen pihentettük. A mintákat ezután 3x5 percig mostuk 1x PBS oldatban. A gümőket ezután a fentebb részletezett módon ágyaztuk és metszettük. A SYTO13 festés során a gümőmetszeteket 5 μM SYTO13 (Invitrogen) oldatban (1x PBS) inkubáltuk 20 percig szobahőn, sötétben. Ezután egyszer mostuk a metszeteket 1x PBS oldatban és mikroszkóp alatt vizsgáltuk a mintákat.

4.3. Molekuláris biológiai módszerek

4.3.1. Növényi DNS tisztítás

A *M. truncatula* frissen leszedett, egy teljes levél triplet leveléből a QuicGene DNS izoláló kittel (Kurabo) tisztítottunk genomi DNS-t a gyártó által mellékelt protokolltól kis mértékben eltérve. A növényi szöveteket a gyártó saját lízis puffere helyett 275 µl CTAB pufferben dörzsöltük el kvarchomok segítségével és 56 ºC-on 1 órát inkubáltuk. A sejttörmeléket 5 percig tartó centrifugálással távolítottuk el (13000 rpm) és 200 µl felülúszóval folytattuk tovább a munkát. A genomi DNS tisztításának többi lépése megegyezett a gyártói ajánlásával. A genomi DNS mennyiségét és minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, melynek részleteit később ismertetem.

4.3.2. Polimeráz láncreakció

A klónozások kivételével a PCR reakciókhoz a DreamTaq DNS polimeráz enzimet használtuk a gyártó által mellékelt pufferrel. A reakciókat 20 µl végtérfogatban mértük össze, melyben: 20 ng genomi DNS; 2 µl 10X DreamTaq puffer, 2 mM $MgCl_2$; összesen 1 pmol primerpár (egyes primerek ugyanolyan koncentrációban); valamint 0,5 unit DreamTaq DNS polimeráz volt. A polimeráz láncreakciókat a MasterCycler EP gradient S (Eppendorf) típusú gépben végeztük az alábbi programot használva: 2 perc kezdeti denaturáció 94 ˚C-on; 35 ciklusban imételve; 30 mp denaturáció 94 ˚C-on, a primerekre optimalizált hőmérsékletű (45-58 ˚C), 30 másodperces primer hibridizáció, 60 másodperc/kilobázis szintézis 72 ˚C-on; 10 perc végső szintézis 72 ˚C-on. A klónozások készített PCR fragmentek előállításáoz Phusion DNS polimerázt használtunk (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) a gyártó által megadott paramétereket betartva, illetve a klónozási módszer sajátosságai miatt az amplifikált fragmentek végeire egy plusz adenin nukleotidot helyeztünk Taq enzim segítségével (+dATP és Taq 30’ 72 ˚C).

Az polimeráz láncreakcióval kapott fragmenteket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A várt fragment méretétől függően 1-2 %-os, 0,5 µg/ml koncentrációban EtBr-ot tartalmazó agaróz gélt használtunk. Az elektroforézis 5 % bórsav pufferrel feltöltött kádban történt 120 V feszültség mellett.

4.3.3. Klónozások

Az általunk előállított valamennyi konstrukciót a Gateway technológia (Life Technologies) segítségével állítottuk elő. A klónozni kívánt DNS darabokat a fentebb már leírt módszerrel állítottuk elő.

4.3.3.1. Az Entry klónok előállítása

A klónozni kívánt DNS darabokat a pCR8/GW/TOPO (Invitrogen Cat. No. K2500-20) vektorba klónoztuk a gyártó által megadott protokollt követve, így előállítva az entry klónokat. Az *IEF* gén kódoló régióját, a promóter szakaszt, illetve a natív promóteres komplementáló genomi részt a mth2-4o4 BAC templátról amplifikáltuk és klónoztuk. A különböző pontmutáns *NSP2* formákat az adott mutáns vonal genomi templátjáról amplifikáltuk. A klónozás során használt primerek listáját és szekvenciáját a melléklet 1. táblázata tartalmazza. Az amplifikációt követően Sanger és munkatársai (1977) által kidolgozott lánctermináció eljáráson alapuló szekvenálással ellenőriztük a fragmenteket minden esetben (Sanger, 1977). A munka során különböző célvektorokba klónozott pDONR207::RPG (cDNS) konstrukció a laborunkban korábban került előállításra; a pDONR207::DMI3 (cDNS) és pDONR207::IPD3 (cDNS) konstrukciókat Kaló Péter (MBK, Gödöllő) bocsátotta rendelkezésünkre.

4.3.3.2. Az expressziós klónok előállítása

Az expressziós klónok előállítására a genti egyetemen létrehozott Gateway célvektorokat használtuk (Plant Systems Biology, VIB-Ghent University, https://gateway.psb.ugent.be/search). Az expressziós klónokat az entry klónok és a célvektorok felhasználásával az LR klonáz II enzim mix (Invitrogen Cat. No. 11791-020) segítségével állítottuk elő, minden esetben a gyártó által mellékelt protokkol betartása mellett. Az előállított konstrukciókat *Escherichia coli* (*E. coli*) törzsekbe transzformálva szaporítottuk fel és minden esetben restrikciós enzimmel végzett emésztésekkel és kolónia PCR segítségével ellenőriztük. A klónokat ezután a megfelelő *Agrobacterium*, vagy *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A törzsekbe transzformáltuk a lentebb leírt módokon.

Genetikai komplementációhoz használt konstrukciók előállítása

Az *ief-1* mutáns funkcionális komplementálásához három különböző konstrukciót készítettünk. Az *IEF* kódoló régióját pK7WG2D és pUB-GW-GFP célvektorokba rekombináltattuk. Az első a

CaMV 35S, a második a pUB (*L. japonicus UBIQUITIN* gén promótere) promóter általi túltermelést tesz lehetővé a növényi sejtekben. Emellett az 1903 bp nagyságú natív promóterrel együtt klónozott *IEF* gént hordozó genomi fragmentet pKGW-RR célvektorba klónoztuk, ezzel biztosítva a saját promóteréről való kifejeződést a komplementáció során. Mind a három konstrukció esetében egy függetlenül termelődő fluoreszcens fehérjét kódoló szakasz is a klón része volt, ami lehetővé teszi a konstrukciókat tartalmazó transzgenikus gyökerek mikroszkópos szelekcióját.

A *nad1-3* és *nad1-4* mutáns állelek komplementálására a pKGW-RR vektorba klónozott pNAD1::NAD1 genomi fragmentet használtuk. A konstrukciót csoportunk együttműködő laboratóriumában (Növény-mikroba Interkació csoport, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, MATE, Gödöllő) dolgozó Domonkos Ágota állította elő. A p35S::NSP2 komplementáló konstrukciót témavezetőm, Kaló Péter allította elő.

Élesztő-két-hibrid kísérletekhez használt konstrukciók előállítása

Az élesztő-két-hibrid kísérletekhez az elkészített *IEF*, $NSP2_{E232K}$ és $NSP2_{D244H}$ és a meglévő *RPG*, illetve kapott *DMI3* és *IPD3* entry klónokat és a pDEST-GADT7 és pDEST-GBKT7 célvektorokat használtuk fel az expressziós klónok előállítására.

Az élesztő-két-hibrid kísérletekben felhasznált egyéb konstrukciókat a laborunkban korábban Borbola Andrea, Kiss Ernő és Oláh Boglárka állította elő, ezek: a NORK, LYK3 és NFP intracelluláris doménjei pGADT7 és pGBKT7 vektorokban; a LIN, MtUSA, MtUSA2, NSP1, $NSP1^{156-554}$, NSP2 és NSP2 D11 a megfelelő pDEST-GADT7 és pDEST-GBKT7 vektorokban.

N. benthamiana infiltráláshoz használt konstrukciók előállítása

Az *IEF* teljes kódoló régióját tartalmazó entry klón és a pK7WGF2-RR célvektor segítségével állítottuk elő a GFP-IEF fúziós fehérjét p35S promóter segítségével túltermelő expressziós klónt, amit az IEF sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára használtunk.

A két-molekulás fluoreszcens komplementációs kísérletekhez (BiFC) szükséges IEF-nYFP és RPG-cYFP fúziós fehérjéket expresszáló klónok előállításához a STOP kodont nem tartalmazó *IEF* és *RPG* entry klónokat, valamint a pUBC-nYFP-DEST, illetve a pUBC-cYFP-DEST célvektorokat használtuk fel.A STOP kodont tartalmazó $NSP2_{E232K}$ és $NSP2_{D244H}$ entry klónokat és a pUBN-cYFP célvektort használtuk fel a pUB promóter segítségével termeltetett cYFP-$NSP2_{E232K}$ és cYFP-$NSP2_{D244H}$ fúziós fehérjék előállítására. A BiFC kísérlethez használt nYFP-

NSP1 és cYFP-NSP2 expressziós klónok a laborunkban rendelkezésre álltak (Kiss Ernő munkája).

A NAD1 fehérje lokalizációjának vizsgálatára a NAD1 gént GFP-NAD1 fúzió formájában termeltettük p35S promóter segítségével. A pK7FWG2 vektorban lévő konstrukciót Kaló Péter csoportjában állították elő és bocsájtották rendelkezésünkre.

A spontán gümőzéshez és pENOD11 kísérletekhez használt konstrukciók

A spontán gümőzési kísérlethez használt p35S::DMI3$^{1\text{-}311}$ – pKGW-RR és p35S::CRE1*, illetve az *pENOD11* aktivitás teszteléséhez használt pENOD11::GUS - pKM43GW klón a laborunkban rendelkezésre állt.

A promoter aktivitás vizsgálatához használt konstrukciók előállítása

Az *IEF* promóter aktivitásának tesztelésére az 1903 bp hosszúságú natív promótert tartalmazó entry klónt és a pMDC164-RR célvektort használtuk az *IEF* promótert és a *GUS* riportergént fúzionálva tartalmazó expressziós klón előállítására. Ez a célvektor is biztosította, hogy a klóntól függetlenül termelődő DsRED fluorescens protein segítségével tudjuk a transzgenikus gyökereket kiválasztani.

A *NAD1* promóteraktivitásának vizsgálatára a komplementáció során is használt 400 bp hosszúságú promótert fúzionáltattuk össze a GUS riportergénnel. A pKGWFS7-RR célvektorban lévő konstrukciót Kaló Péter csoportjában állították elő és bocsájtották rendelkezésünkre.

4.3.4. Felhasznált baktériumtörzsek

A klónozások során különböző *E. coli* törzseket használtunk. A pCR8/GW/TOPO vektorba klónozott konstrukciókat *E. coli* One Shot Mach1-T1 (Invitrogen) gyári kompetens sejtbe transzformáltuk. Az üres célvektorokat *E. coli* DB3.1. törzsekben tartjuk fent. Az entry klón és a célvektor segítségével előállított expressziós klónokat *E. coli* OmniMax 2T1 törzsekbe transzformáltuk.

A *M. truncatula* gyökértranszformáláshoz az egyes expressziós klónokat tartalmazó *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 törzseket használtunk.

A *Nicotiana benthamiana* levélben történő tranziens génexpresszióhoz *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzset használtunk. Ez a törzs a pCh32 plazmidon virulencia géneket hordoz, ezáltal hatékonyan transzformálja a növényi sejteket.

4.3.5. Baktérium transzformálási módszerek

Az előállított DNS konstrukciókat különböző *E. coli* és *Agrobacterium* törzsekbe transzformáltuk kétféle módszer segítségével. A kémiai kompetens sejtek transzformálására hősokkot alkalmaztunk (42 ºC, 120 s). Az elektro kompetens sejtek esetén pedig magas feszültségű sokkot alkalmaztunk (2,5 kV, 4-9 ms), 1-2 mm-es elektroporáló küvették segítségével, egy BIO-RAD GenePulser Xcell^{TM} készülékben.
A sikeres transzformánsok szelektálására a bejuttatni kívánt plazmid által biztosított antibiotikum szelekció mellett az *E. coli* transzformánsokat LB lemezen 37 ºC-on, az Agrobacterium törzseket TA táptalajon 30 ºC-on növesztettük.

4.3.6. Növény transzformálási módszerek

Kísérleteink során kétféle növénytranszformálási rendszerben dolgoztunk. Az egyik a *M. truncatula* „hairy-root" transzformálási rendszer, ahol az *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 törzs segítségével tudjuk az általunk vizsgált gént a növény gyökerébe bejuttatni és ott kifejeztetni (Boisson-Dernier et al., 2001). A módszerrel előállított növényeknek csak az újonnan képződő gyökerei közt lesznek transzgenikus gyökerek. A másik módszer esetén *Nicotiana benthamiana* leveleket transzformálunk *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 segítségével (Yang, 2000). Ebben az esetben az általunk vizsgált fehérje tranziensen 4-5 napig termelődik.

4.3.6.1. *Agrobacterium rhizogenes* közvetítette transzformálás transzgenikus gyökerek előállítására

Az *A. rhizogenes* Arqua1 közvetítette *M. truncatula* ún. "hairy root" transzformálást az eredetileg Boisson és mtsai (2001) által kidolgozott módszer módosított változatával végeztük. A konstrukciókat tartalmazó Agrobacterium törzseket a transzformálás előtt közvetlenül átoltottuk és vastag pázsitra növesztettük. A kísérletben használt növényi csírák gyökércsúcsát levágtuk és a baktérium pázsitba mártottuk úgy, hogy a sérülés helyén szemmel jól látható mennyiségű baktérium legyen. Ezt követően a csírákat steril nitrogénmentes Fahreussal átítatott szűrőpapirra helyeztük és lefedve pihentettük 2 órán keresztül. Ezután a csírákat steril zeolit szubsztrátba helyeztük és lefedve 2 hétig rhizóbiummentes körülmények között neveltük. Ez alatt az idő alatt fejlődnek a növényen az új gyökerek, melyek között transzgenikus és nem-transzgenikus gyökerek is vannak. A kísérleti körülményektől függően ezután fertőztük a növényeket rhizóbium baktériumokkal, vagy a spontán gümőzési kísérletek esetén további 4-5 hétig neveltük

rhizóbiummentes körülmények mellett. A transzformáns gyökereket a vektoron lévő GFP és DsRED marker gén segítségével, Nikon C-DSS230 típusú fluorescens sztereo mikroszkóp alatt azonosítottuk.

4.3.6.2. *Nicotiana benthamiana* levélinfiltrálás tranziens génexpressziós vizsgálatokhoz

N. benthamiana levélinfiltrációhoz, *A. tumefaciens* C58C1 baktériumtörzseket használtuk. Az infiltrálni kívánt baktérium törzsek telepeit a megfelelő antibiotikummal kiegészített 5 ml LB folyékony tápoldatba oltottuk és 30 °C-on növesztettük 16 órán keresztül. A növesztés után a kultúrát 20 ml friss antibiotikummal kiegészített folyékony LB tápoldatba átoltottuk, ami ezeken felül tartalmazott 10 mM MES-t (pH 5,6) és 20 µM Acetosiringon-t (Sigma) és 16 óráig 30 °C-on növesztettük. A felnőtt kultúrát centrifugáltuk (4000 rpm, 15 perc). A pellettet felszuszpendáltuk az MMA oldattal. Az infiltrálni kívánt szuszpenziókat OD_{600} = 0,3 értékre higítottuk. A konstrukciókat tartalmazó *Agrobacterium* törzsekkel együtt a p19 RNS csendesítést gátló (Silhavy et al., 2002;Voinnet et al., 2003) konstrukciót tartalmazó törzset is infiltráltuk. A törzsben lévő konstrukció hatékonyan gátolja a növényben az RNS csendesítést, ezáltal növeli a fehérjetermelés hatékonyságát. Az infiltrálni kívánt konstrukciókat hordozó *Agrobacterium* törzseket egyenlő arányban kevertük és 3 órán át sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően az *Agrobacterium* keverékeket 6-8 hetes *N. benthamiana* teljesen kifejlett levelének fonákja felől infiltráltuk a növénybe, majd ezután a növényeket másnap reggelig sötétben tároltuk a transzformáció hatékonyságának növelése érdekében. Az infiltrált leveleket 3-4 nap elteltével szedtük le és analizáltuk.

A fehérjék sejten belüli lokalizációját, illetve a BiFC vizsgálatokat Leica SP5 AOBS típusú konfokális mikroszkóp segítségével végeztük. A különböző fluoreszcens fehérjék esetén használt gerjesztés: 514 nm (YFP), 488 nm (EGFP) és 543 nm (DsRED), míg az emissziós tartomány: 525-600 nm (YFP), 500-540 nm (EGFP) és 580-649 nm (DsRED). A képeket LAS AS Lite (v2.2.1 build 4842, Leica) szoftver segítségével dolgoztuk fel.

4.3.7. Élesztő transzformálás

Az élesztő-két-hibrid kísérlethez használt konstrukciókat *Saccharomyces cerevisiae* PJ-69-4A törzsbe transzformáltuk a gyártó által ajánlott protokoll pontos betartása mellett (*Clontech* Laboratories, Inc. www.*clontech*.com. Protocol No. *PT3247-1*. 2.). Ez a kémiai transzformáláson alapuló technika lehetővé teszi egyszerre két különböző, vizsgálni kívánt konstrukció együtt

történő sikeres élesztőbe-sejtekbe történő bejuttatását. A kísérletek során a gyártó által használt komponeneseket használtuk (Clontech Cat. No. 630494), kivéve a lazac sperma DNS-t (Sigma CAS Number: 438545-06-3). A kettős transzformáns PJ69-4A élesztő törzseket SD (minimál) – Leu és Trp (SD-LT) lemezen szelektáltuk, mert kizárólag a GADT7 és GBKT7 konstrukciókat együttesen tartalmazó élesztő képes nőni az ilyen lemezeken. Az élesztőbe transzformált gének termékei közötti esetleges interakciót cseppentéses kísérleti rendszerben teszteltük. A konstrukciókat tartalmazó élesztő törzsek 2-3 kolóniáját SD-LT folyékony táptalajba oltottuk és 16 órán át 30 °C-on növesztettük. Ezután a kultúrákat OD_{600} = 0,1 értékre higítottuk, majd 3-4 lépcsős 10X higítási sort késztettünk belőlük. Az így kapott szuszpenziókból párhuzamosan 5-5 µl-t cseppentettünk SD-LT/SD-HLT és SD-AHLT lemezekre (az SD-HLT hisztidin, míg az SD-AHLT hisztidin és adenin mentes táptalajt jelent). Az SD-HLT táptalajt opcionálisan különböző koncentrációban 3-amino-1,2,4-triazollal (3-AT) egészítettük ki. Abban az esetben, ha van pozitív kölcsönhatás a vizsgált két fehérje között, akkor az élesztő képes felnőni. A hisztidin meglehetősen gyenge szelekciót tesz lehetővé, sok esetben kapunk fals pozitív eredményeket, ha csak ezt a szelekciót használjuk.

4.3.8. β-Galaktozidáz enzimaktivitás mérés és western-blot analízis

A β-Galaktozidáz enzimaktivitás mérések elvégzéséhez minden esetben a gyártó által ajánlott protokollt használtuk (*Clontech* Laboratories, Inc. www.*clontech*.com. Protocol No. *PT3247-1*. 2.). Az élesztő-két-hibrid transzformálási módszerrel bevitt konstrukciókat tartalmazó *S. cerevisiae* PJ-69-4A törzsek 2-3 kolóniáját SD-LT folyékony táptalajba oltottuk és növesztettük 16 órán át 30 °C-on. Ezután a felnőtt kultúrákból 2 ml-t hozzáadtunk 8 ml YPDA folyékony táptalajhoz és növesztettük 30 °C-on amíg a kultúra optikai denzitása (OD_{600}) el nem érte a 0.5 értéket (pontos OD_{600} értéket felírásra került). Ezekből a kultúrákból használtunk kombinációnként 1,5 – 1,5 ml-t. Ugyanennyi élesztő kultúrát használtunk a western-blot analízishez is.

A 1,5 ml élesztőkultúrát eppendorf csőbe tettük és 13000 rpm (10000 x g) –el fugáltuk 30 másodpercig, majd a felülúszót eltávolítottuk. Az így keletkezett pelletthez 1,5 ml Z puffert adtunk és vortexszel felszuszpendáltuk. Újabb centrifugálást követően eltávolítottuk a szupernatanst és a pelletthez 300 µl of Z puffert adtunk (ebben az esetben a kultúra koncentrációs értéke 5x mértékű). 100 µl sejtszuszpenziót új eppendorf csőbe tettük, melyeket folyékony nitrogénbe helyeztünk 1 percig, majd a csöveket 37 °C-os vízfürdőben melegítettünk újabb 1 percig. A fagyasztás/melegítés lépést 3x ismételtük. Egy csőbe csak 100 µl Z puffert helyeztünk

(BLANK). Ezután minden csőhöz 0,7 ml β-mercaptoethanolnal kiegészített Z puffert adtunk. Ennél a pontnál elindítottuk az időzítőt és minden csőhöz 160 µl ONPG (Z pufferben oldva) oldatot adtunk és 30°C-on inkubáltuk. A sárgás szineződés megjelenésekor minden csőhöz 0,4 ml 1 M-os Na2CO3 oldatot adtunk és ezzel a reakciót leállítottuk, az inkubáció idejét (percben számolva) felírtuk. A reakciócsöveket 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-el, majd a szupernatanst új csőbe helyeztük. A spektrofotométert a BLANK csövet használva A420-ra kalibráltuk és minden minta OD_{420} értékét megmértük. A β-galacaktozidáz egység (unit) számítása a következő egyenlet alapján történt: $1000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600})$ ahol: t = inkubáció ideje (perc), V = 0,1 ml x a koncentrációs érték (5x), $OD_{600} = A_{600}$ a kiindulási 1 ml kultúra optikai denzitás értéke.

A western blot analízishez az élesztő-két-hibrid transzformálási módszerrel bevitt konstrukciókat tartalmazó *S. cerevisiae* PJ-69-4A törzsek 2-3 kolóniáját SD-LT folyékony táptalajba oltottuk és növesztettük 16 órán át 30 °C-on. Ezután a felnőtt kultúrákból 2 ml-t hozzáadtunk 8 ml YPDA folyékony táptalajhoz és növesztettük 30 °C-on, amíg a kultúra optikai denzitása (OD_{600}) el nem érte a 0,5 értéket (pontos OD_{600} értéket felírásra került). Ezekből a kultúrákból használtunk kombinációnként 1,5 – 1,5 ml-t. A 1,5 ml élesztő sejtkultúrát 13000 rpm (10000 x g) –el fugáltuk 30 másodpercig, majd a szupernatanst eltávolítottuk. Az így keletkezett pelletthez 100 µl 1x Laemmli puffert adtunk (Bio rad #1610737), 5 percig forraltuk, majd sejtkultúrát 13000 rpm (10000 x g) –el fugáltuk 5 percig. A fugálás után a felülúszóból használtunk mintánként 20 µl-t melyeket 10 %-os Tris-glycine SDS-PAGE akrilamid gélen szétválasztottunk. A szétválasztott fehérjék átvitele a gélből nitrocellulóz membránra a következő paraméterek betartása mellett történt: 4 °C-on, 16 órán keresztül, 20V-on. A membrán kezelése a következő lépésekben zajlott, minden lépés lassú billegtetés mellett:

1. A nitrocellulóz membrán blokkolása 5% tejpor, TBST (1x PBS + 0,1% Tween20) oldatban 1 órán át.
2. A membrán inkubálása az elsődleges anti-HA ellenanyaggal (Invitrogen, cat. 26183) 1:3000x-es higításban (5% tejpor, TBST (1x PBS + 0,1% Tween20)) 3 óráig
3. A membrán mosása 3x10 percig (TBST oldatban)
4. A membrán inkubálása a másodlagos „anti-mouse” ellenanyaggal 1:10000x-es higításban (5% tejpor, TBST (1x PBS + 0,1% Tween20)) 1 óráig
5. A membrán mosása 3x10 percig (TBST oldatban)
6. A membrán mosása 3x10 percig (PBS)
7. A kemilumineszcens szignál detektálása filmen.

4.4. Felhasznált oldatok összetétele

LB médium

Tripton	10 gramm/liter
Élesztő kivonat	5 gramm/liter
NaCl	5 gramm/liter
agar	15 gramm/liter

pH= 7,5

TA médium

Tripton	10 gramm/liter
Élesztő kivonat	1 gramm/liter
NaCl	5 gramm/liter
$MgSO_4$ (1M)	1 ml
$CaCl_2$ (0,1 M)	10 ml
aga	15 gramm/liter)

100X nitrogén szegény Fahreus növényi tápoldat

100X Macro	
KH_2PO_4	70 mM
$MgSO_4$	50 mM
Fe-EDTA	5 mM
NH_4NO_3	50 mM
100X Foszfát	
Na_2HPO_4	80 mM
100X Micro	
H_3BO_3	160 μM
$CuSO_4$	60 μM
$NaMnO_4$	50 μM
$ZnSO_4$	60 μM
$MnSO_4$	60 μM
100X Kalcium	
$CaCl_2$	100 mM

Volldünger műtrágya összetétel

N (nitrogén)	14%
P (foszfor)	7%
K (kálium)	21%
Mg (magnézium)	1%
mikrolemek (B, Cu, Mn, Fe, Zn)	Σ 1%

1x PBS oldat

NaCl	8 gramm/liter
KCl	0,2 gramm/liter
Na_2HPO_4	1,44 gramm/liter
KH_2PO_4	0,24 gramm/liter

pH= 7,4

CTAB puffer

CTAB	2%
Tris (pH 8)	0,1 M
EDTA	20 mM
NaCl	1,4 M
β-merkaptoetanol	0,5 %

MMA oldat

MES (pH= 5.6)	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
Acetosiringon	150 μM

GUS festő oldat

X-Gluc	2mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	0,1 %
Sarcosyl	0,1 %
SDS	0,05 %
Kálium-ferriciannid	1 mM
Kálium-ferrocianid	1 mM

LacZ festő oldat

X-Gal	0,1 %
Kálium-ferriciannid	1 mM
Kálium-ferrocianid	1 mM

β-Galaktozidáz enzimaktivitás méréshez használt oldatok

Z puffer

Na2HPO4 • 7H2O	16,1 g/liter
NaH2PO4 • H2O	5,50 g/liter
KCl	0,75 g/liter
MgSO4 • 7H2O	0,246 g/liter

pH 7,0-re állít ás sterilizál.

Z buffer + β-mercaptoethanol

100 ml of Z puffer + 0,27 ml of β-mercaptoethanol

ONPG oldat (o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside; Sigma Cat No. N-1127)

4 mg/ml Z pufferben oldva

western-blot analízishez használt oldatok

1XPBS

NaCl	8 g/liter
KCL	0,2 g/liter
Na_2HPO_4	1,44 g/liter
KH_2PO_4	0,24 g/liter

pH 7,4-re állít és sterilizál

SDS-page puffer

Tris-HCL	3 g/liter
Glycine	14.4 g/liter
SDS	1 g/liter

Transzfer puffer

Tris-HCl	3 g/liter
Glycin	14,4. g/liter
96%-os EtOH	100 ml

1,0M Tris-HCl pH 6,8
Tris-base 12,11 g/100ml
pH 6,8-re állít és sterilizál

1,5M Tris-HCl pH 8,8
Tris-base 18,17 g/100ml
pH 8,8-re állít és sterilizált

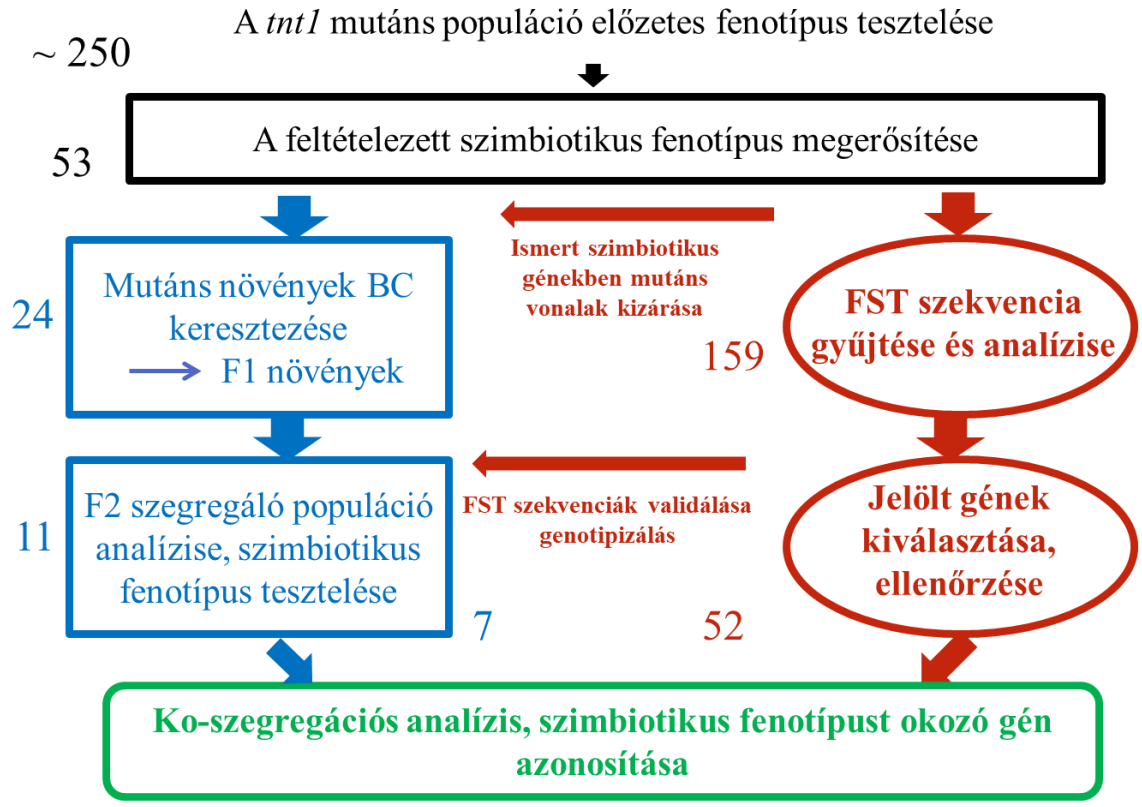
4.5. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízisekhez az IBM statistics 20 szoftvert használtuk. Az IEF fehérje homológokkereséséhez és vizsgálatához az NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) adatbázisát használtuk. A fehérje szekvenciák illesztésére a MEGA-X szoftver / ClustelW programot használtuk, a filogenetikai fa pedig a Neighbor-joining módszerrel készült.

5. Eredmények

5.1. Szimbiotikus növényi mutánsok azonosítása

Az Európai Únió 6. keretprogramja által támogatott konzorcium keretében több mint 2000 különböző mutáns vonalat hoztak létre *M. truncatula* 2HA vonalban *Tnt1* inszerciós mutagenezissel (Tadege et al., 2008;Iantcheva et al., 2009). Erről később kiderült, hogy nemcsak bevitt *Tnt1* retrotranszpozon ugrott és inszertálódott be számtalan helyre, hanem a M. truncatula saját transzpozíciós eleme, a MERE1 is (Rakocevic et al. 2009), megnövelve ezzel a vonalankénti mutációk számát. A mutánsgyűjtemény magjainak egyik fenntartója a szegedi kutatócsoportunk, ahol a mutáns park kb. 1000 vonalának (melyek számítások szerint úgy 20-25 ezer inszerciót hordozhatnak) fenotípus szűrését is elvégezték korábban, melynek eredményeként közel 250 feltételezhetően szimbiotikus fenotípust mutató egyedet is tartalmazó vonalat azonosítottak. Vizsgálataink tárgyát ezek a vonalak képezték, melyek segítségével elkezdtük új szimbiotikus mutánsok és a bennük mutációt szenvedett szimbiotikus gének azonosításának folyamatát. Az elvégzett munkafolyamatot az 5.1. ábra szemlélteti.



5.1. ábra. A szimbiotikus növényi gének azonosításának munkafolyamata. A részletes leírás és a számok magyarázata a szövegben található.

A közel 250 vonal 30 - 30 egyedének szimbiotikus növényi tesztjét elvégezve és kiértékelve 53 vonal esetében erősítettük meg, hogy valóban vannak köztük szimbiotikus fenotípust mutató növények. A mutáns szimbiotikus fenotípust mutató egyedek száma a vonalakban már jelezte, hogy mindegyik recesszív mutáció eredménye, így csak homozigóta formában nyilvánul meg. A mutánsok fenotípusát a gümőképződés alapján a következő kategóriákba soroltuk: **Nod$^-$** mutánsok, melyek gyökerén a gümőképződés semmilyen jelét nem lehetett megfigyelni; a **Fix$^-$** mutánsokon megjelentek gümőkezdemények vagy kis, kerek, fehér gümők, azonban ezek a gümők nem érték el a teljes fejlettséget és így nitrogénkötésre képtelen voltak; míg a **Fix$^{+/-}$** növények esetén a gümőfejlődés szinte teljesen végbement, de a növények fejlettségi állapota elmaradt a vad típushoz képest, jelezve, hogy a nitrogénkötés hatékonysága valószínűleg alacsonyabb ezen egyedek gümőiben.

A mutáns növényekből genomi DNS-t tisztítottunk és egy kollaborációs munka keretében új generációs szekvenálási módszerekkel, úgynevezett FST (Flanking Sequence Tag) szekvenálással határozták meg az egyes vonalakban lévő inszerciók határoló szekvenciáját - és így azok helyét - a *M. truncatula* genomban. Az FST adatok feldolgozása után először azonosítottuk és kizártuk a további munkából azokat a vonalakat, amelyek már ismert szimbiotikus génben hordoznak mutációt. Így az első FST értékelések után még 24 mutáns vonal maradt a további munkafolyamatokra, melyekben az FST-k alapján 159 inszerció volt kódoló régióban, vagyis ennyi jelölt gén volt (5.1. ábra), de a keresztezések és szegregáló populációk létrehozásához tovább szűkítettük ezt a listát a fenotípusuk alapján. Félretettük azokat a vonalakat, amelyek a szimbiotikus fenotípus mellett gyökérfenotípust is mutatnak, hiszen nem lehettünk biztosak abban, hogy nem a gyökérfejlődés hibája okozta-e a megfigyelt szimbiotikus fenotípust, és egyelőre kizártuk a Fix$^{+/-}$ mutánsokat is, csak az egyértelmű Fix$^-$ fenotípusú vonalakkal foglalkoztunk. Végül 11 inszerciós vonalból származó szimbiotikus mutáns egyedet kereszteztünk vissza a vad típusú 2HA növénnyel, majd állítottunk elő önbeporzott szegregáló F2 populációt (vonalanként átlagosan 40 egyedet felnövesztve). Ezzel párhuzamosan bioinformatikai módszerekkel tovább elemeztük a vonalakban azonosított FST-k által meghatározott 52 jelölt gén szekvenciáját. A 11 családból hétnél végeztük el a fenotípus és a rendelkezésra álló adatok alapján a jelölt gének genotípusainak meghatározását és a ko-szegregációs analízist. Ezen hét vonal fenotípusának rövid összefoglalása és a bennük azonosított inszerciók száma az 5.1. táblázatban látható, az inszerciók pontos genomi pozíciói a melléklet 2. – 8. táblázataiban láthatók.

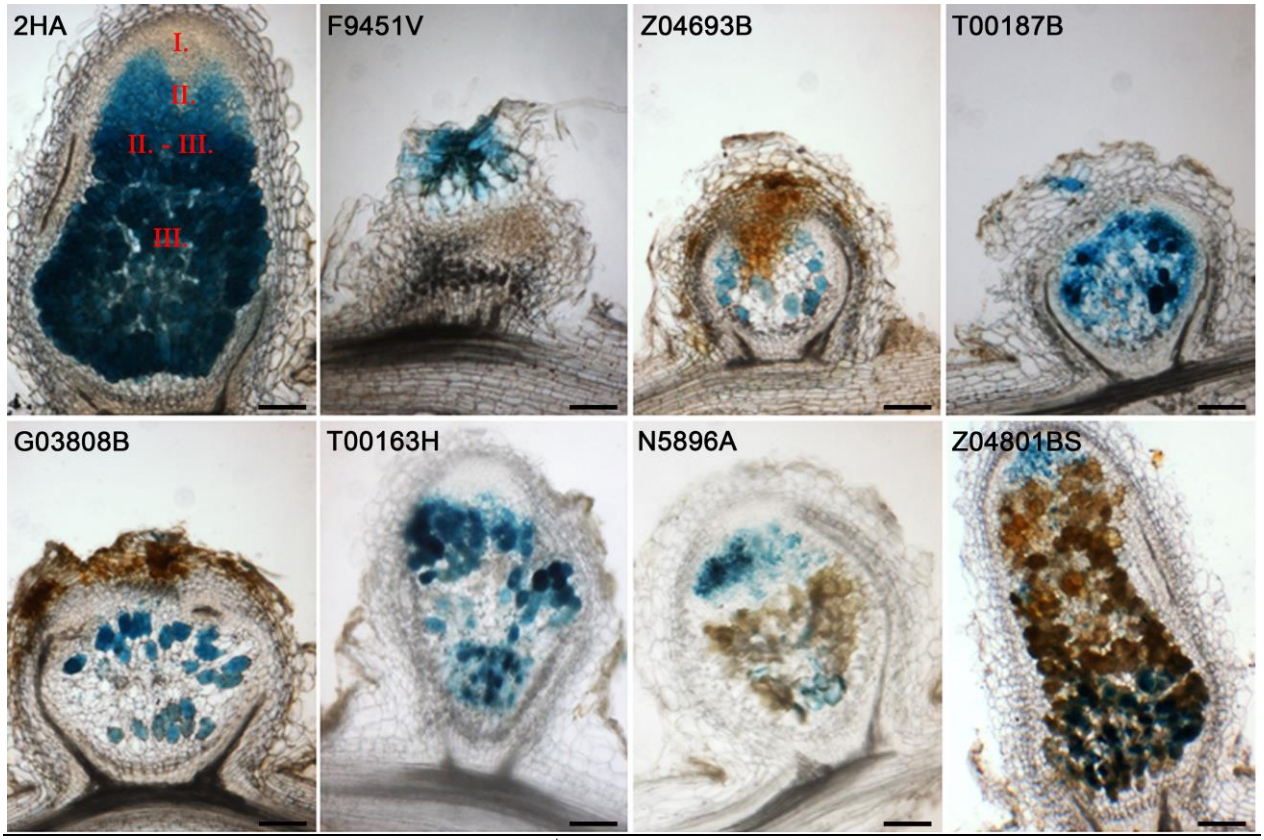
vonal	mutáns vonal fenotípusa	FST
F9451V	inváziós mutáns, gümő bakteriális inváziójának defektusa	9
Z04693B	korai gümőfejlődési mutáns, közvetlenül az invázió után a gümőfejlődés leáll	2
T00187B	korai gümőfejlődési mutáns, infekciós fonálból való lefűződés defektusa	11
G03808B	korai gümőfejlődési mutáns, közvetlenül az invázió után a gümőfejlődés leáll	9
T00163H	a gümőfejlődési program végbemegy, korai öregedés fenotípus	16
N5896A	rhizóbum fertőzést követő erős védekezési reakciók indulnak be a gümőben	31
Z04801BS	rhizóbum fertőzést követő erős védekezési reakciók indulnak be a gümőben	3

5.1. táblázat: Az azonosított Fix$^-$ vonalak fenotípusa és a bennük azonosított inszerciók (FST) száma. A vastag betűvel kiemelt mutáns vonalakkal foglalkozom részletesebben a dolgozatomban.

A szimbiotikus fenotípus pontosabb vizsgálatához a mutáns növényeket a GUS riporter gént hordozó *S. medicae* szimbionta partnerrel fertőztük. A fertőzést követő 14. naptól kezdve a növényekről gümőket szedtünk, metszettük és GUS festéssel vizsgáltuk, hogy meddig jutott el a szimbionta baktérium a vad típushoz képest (5.2. ábra.). A legkorábban az F9451V vonal mutánsában akadt el a folyamat, ahol a baktériumok képtelenek voltak a fejlődésnek indult gümő inváziójára, azok a gümő felső, apikális részén halmozódtak fel. A Z04693B mutánsban a gümősejtekbe bejutottak a baktériumok, azonban közvetlenül utána az invázió leállt és csak néhány növényi sejtbe jutottak be a baktériumok, illetve a gümő apikális részén erős barna pigmentáltság jelentkezett ott, ahol a merisztémának kellene lennie. A T00187B, illetve a G03808B vonal mutánsaiban az invázió a Z04693B mutáns vonalhoz képest továbbment, azonban a gümő fejlődése itt is korán leállt, nem alakult ki a merisztéma. A T00163H mutánsban a gümőfejlődés részeként már kialakult a merisztéma is. A baktériumok az inváziós és átmeneti zónában a vad típushoz hasonló mennyiségben voltak jelen, azonban a nitrogénkötő zónában szinte teljesen hiányoztak. A N5896A és Z04801BS mutánsokban a bakteriális invázió megtörtént, a merisztéma kialakult, de a nitrogénkötő zóna helyén a növényi sejtek elhaltak és erős barna pigmentáltság jelentkezett a gümő belsejében.

Mind a hét vonal esetében a szegregáló populációban a mutáns szimbiotikus fenotípusú egyedek megjelenése az egygénes recesszív mutációt alátámasztó 1:3 arányú volt. Mindegyik populációban elvégeztük a jelölt génekre az egyedek genotipizálását, és összevetettük, hogy az adott inszerciós mutációt homozigóta formában hordozó egyedek melyik gén esetében esnek egybe a mutáns fenotípust mutató egyedekkel. A hét vizsgált mutáns vonal közül eddig két esetében sikerült azonosítani így a mutációt szenvedett szimbiotikus gént (ezeket ismertetem

részletesebben a későbbiekben), a többinél feltételezhetően még további inszerciók lehetnek jelen a vonalakban, melyeket nem tartalmaznak az FST adataink. Az eredmények alapján az N5896A vonal a már ismert szimbiotikus *NAD1* gén egy új allélja (*nad1-4)* és a továbbiakban, mint *nad1-4* hivatkozok rá. Az F9451V vonal segítségével azonosított szimbiotikus gén még nem volt ismert, így mi nevezhettük el, a későbbiekben tárgyalt eredmények alapján az *IEF* nevet kapta és a vonalra, mint az *IEF* gén első mutáns allélja (*ief-1*) hivatkozok a továbbiakban.



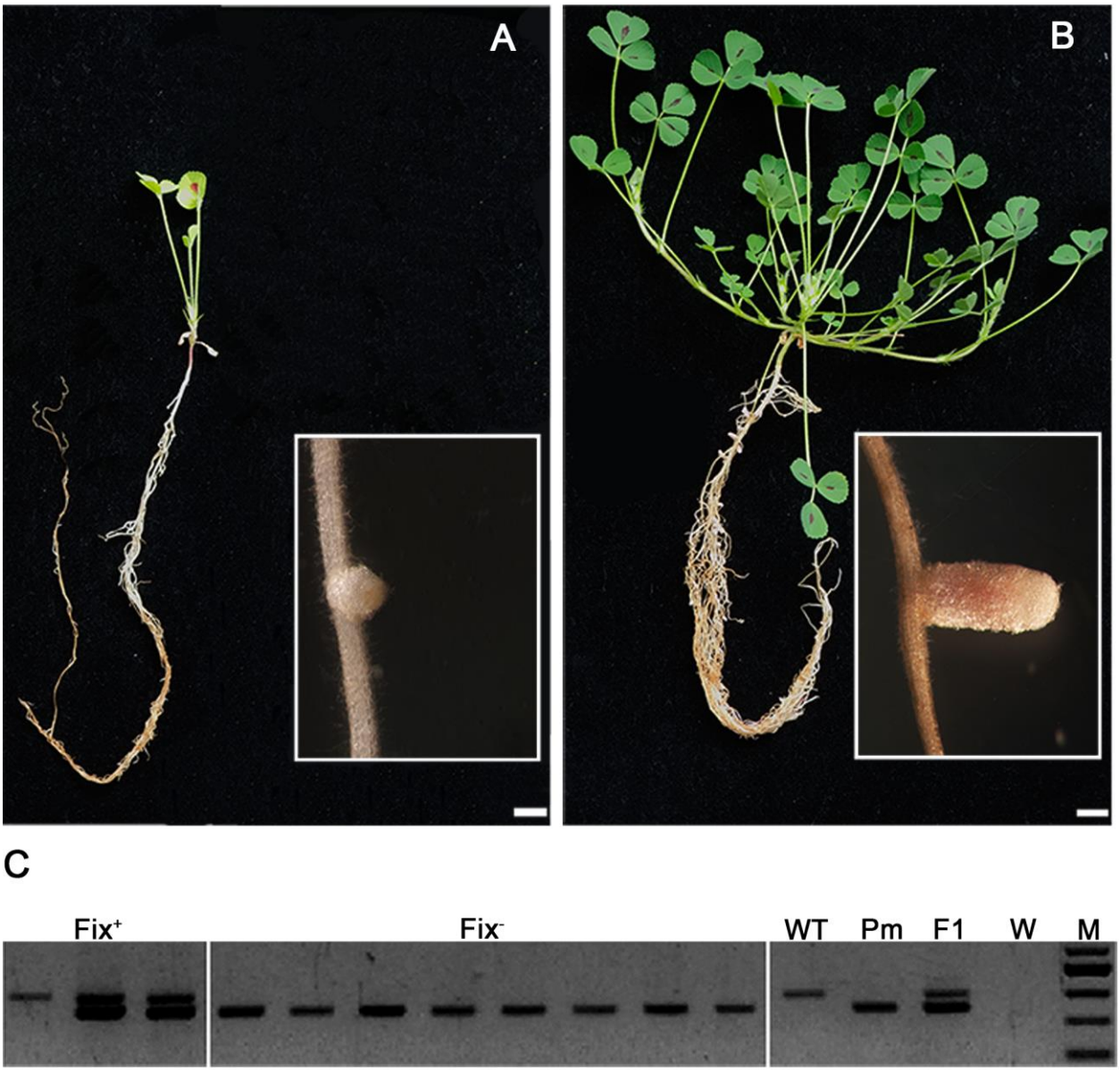
5.2. ábra. Azonosított *M. truncatula* Fix$^{-/-}$ mutánsok gümőinek szimbiotikus fenotípusa. A kék festődés mutatja a *GUS* marker gént hordozó rhizóbium baktérium jelenlétét a gümőben három héttel a *Sinorhizobium mediceae* WSM419+GFP-GUS törzzsel történő fertőzést követően.
Méretarány: 200 µm, **Metszetvastagság:** 70 µm, **I.:** merisztéma, **II.:** inváziós zóna, **II.-III.:** átmeneti zóna, **III.:** nitrogénkötő zóna. Dolgozatomban részletesen az F9451V és N5896A mutáns vonalakkal foglalkozok részletesebben.

5.2. Az *IEF* gén azonosítása és funkcionális analízise

Ebben a fejezetben az *ief-1* mutáns szimbiotikus fenotípusának részletes jellemzését, a mutációt szenvedett szimbiotikus gén azonosítását és funkcionális analízését mutatom be. Az általunk azonosított génnek az ***IEF*** (**I**nfection-related **E**pidermal **F**actor) nevet adtuk a funkcionális analízisek alapján, a vizsgált allél pedig az *ief-1* nevet viseli és a bemutatott eredmények egy elsőszerzős közleményemben kerültek publikálásra (Kovacs et al., 2022)

5.2.1. Az *ief-1* mutáns részletes jellemzése

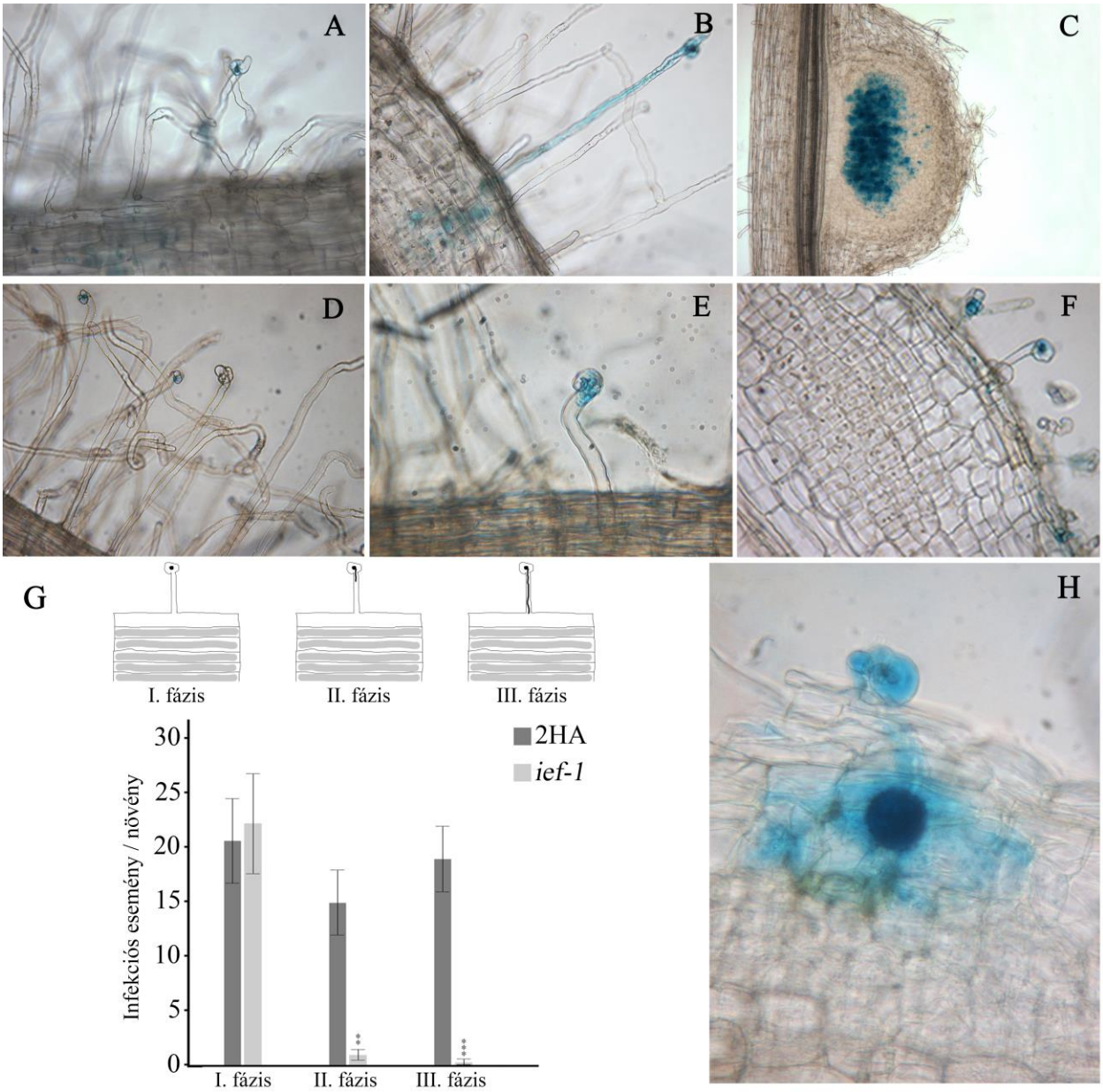
A vizsgálatainkba bevont *ief-1* mutáns nitrogénszegény tápközegben a nitrogénéhezés jellegzetes tüneteit mutatta annak ellénére, hogy a *S. medicae* szimbionta partnerrel történő fertőzés lezajlott már a növény növesztésének kezdeti fázisában. A fertőzést követő 6. héten az *ief-1* mutáns növények a nitrogénéhezés egyértelmű jeleit mutatták: gyengén fejlett hatások, halványzöld leveleket figyelhettünk meg (megfelelő nitrégnellátottság esetén a mutáns nem mutatja ezeket a szár – és gyökér fenotípusokat), míg a gyökereiken apró és barnás elszineződést mutató gümőkezdeményeket (bumpok) találtunk (5.3. ábra /A). Ezzel szemben a hasonló korú vad típusú növények gazdagon elágazó zöld hajtással és fejlett sötétzöld levelekkel rendelkeznek, gyökerükön pedig megnyúlt és rózsaszín gümőket találunk a leghemoglobin felhalmozódásának köszönhetően (5.3. ábra /B). Ezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy az *ief-1* mutáns képtelen a nitrogénkötő szimbiózis kialakítására szimbiotikus partnerével. Az *ief-1* mutáns egyéb fenotípusát nem detektáltuk, annak kizárólag szimbiotikus fenotípusát állapítottuk meg.



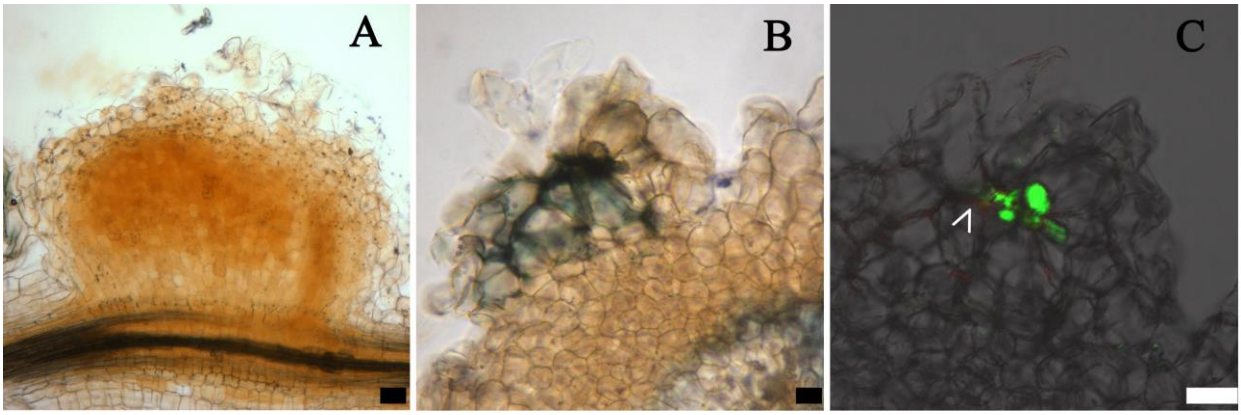
5.3. ábra: Az *ief-1* mutáns és 2HA vad típusú növények képei 6 héttel a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzés után, és az *ief* X 2HA szegregáló populáció ko-szegregációs analízisének reprezentatív eredménye. Nitrogénéhezés egyértelmű jele és az *ief* mutáns gyökereken látható gümőkezdemények sztereomikroszkópos képe (A) a vad típusú kontroll mellett (B). A Medtr1g087720 vad típusú (405 bp) és mutáns (352 bp) alléljét egy reakcióban kimutató PCR amplifikáció eredménye a szegregáló populáció egyedeiből származó DNS mintákon (C). A mutáns fenotípust mutató egyedek mindegyike homozigóta mutáns a Medtr1g087720 génre nézve, míg a vad típusú növények homozigóták a vad allélra, vagy heterozigóták. (WT: vad szülői növény; Pm: mutáns szülő; F1: hibrid növény; W: PCR negatív kontroll, M: DNS marker).

Annak érdekében, hogy pontosabban meghatározzuk a szimbiotikus kapcsolatnak azt a lépését, amelyben elakad a gümőfejlődés és bakteriális invázió, vagyis a mutációt szenvedett gén a folyamat melyik szakaszához szükséges, az *ief-1* szimbiotikus fenotípusát korábbi időpontokban vizsgáltuk. A mutáns és vad típusú növényeket minden esetben *GFP-GUS* riportergént hordozó *S. mediceae* WSM419 baktérium törzzsel fertőztük és a gyökereken és gümőkben a baktérium jelenlétét GUS festéssel vagy konfokális mikroszkópos technikákkal vizsgáltuk.

A fertőzést követő 2. napon a vad típusú növényeken megfigyelhetjük a gyökérszőrök görbülését (5.4. ábra /A), melyet az infekciós fonál fejlődése követ (5.4. ábra/B), majd a párhuzamosan kialakuló gümőt elárasztják a baktériumok (5.4. ábra /C). A gyökérszőrgörbülés és az infekciós fonál fejlődési állomásainak előfordulási gyakoriságát az 5.4. ábra /G panelje mutatja, ahol a gyökérszőrgörbülés (I. fázis), az infekciós fonál iniciáció (II. fázis) és a fejlődésnek indult infekciós fonalak (III. fázis) fejlődési stádiumait számoltuk meg. A mutáns növényeken a fertőzést követő 2. napon a vad típussal megegyező morfológiájú (5.4. ábra/D) és számú (5.4. ábra/G) gyökérszőrgörbülést (I. fázis) figyeltünk meg. A fertőzést követő harmadik napon azonban a mutáns növényeken elenyésző számú (5.4. ábra/G) infekciós fonál iniciációt (II. fázis) és fejlődésnek induló infekciós fonalat (III. fázis) találtunk. Ezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy az *ief-1* mutáns képtelen a normális infekciós fonál fejlesztésére a szimbionta baktériummal való fertőzést követően. Még 6 nappal a fertőzést követően is csak abnormális, éppen csak az iniciáció fázisában lévő infekciós fonalakat figyeltünk meg (5.4. ábra /E). Ebben az időpontban már fejlődésnek induló gümőprimordiumakat is láthattunk a mutáns növényen, azonban a baktériumok képtelenek elárasztani gümőkezdeményt (5.4. ábra /F). A gümőfejlődés és a baktériális invázió folyamatos kommunikációban van egymással, amennyiben az egyik folyamat leáll, úgy a másik is blokkolódik különböző visszacsatolások révén. Feltételezhetően a gümőprimordium kialakulásában megfigyelt 2 napos csúszás a mutáns növényben az elakadt invázió következménye. A fertőzést követő 12 nappal a baktériumok néhány esetben elérték a gyökérszőrsejtek alapját, azonban ott felhalmozódtak és egy léggömbszerű struktúrát képeztek az epidermisz sejt alján, ennél beljebb azonban sosem jutottak (5.4. ábra /H). Az elakadt infekció melletti növényi sejtek enyhe barnás elszíneződést mutattak ebben a fázisban, amely a növényi védekezési reakciók aktiválódására utalhat (5.4. ábra /H).



5.4. ábra: Az *ief-1* növény infekciós fenotípusa a *S. medicae* WSM419 baktériummal történt fertőzés követően. 2HA vad típusú növényen kialakuló normál gyökérszörgörbülés (A), infekciós fonál fejlődés (B) és bakteriális invázió a fejlődő gümőben (C). Az i*ef-1* mutánson is megtörténik a normál gyökérszőrgörbülés (D), azonban ezt követően abnormális és elhúzódó infekciós fonál iniciáció figyelhető meg (E). Ezzel párhuzamosan fejlődésnek indulnak a gümők (megjelennek a primordiumok), de az invázió hiányában nem fejlődnek tovább (F). Az inváziós események statisztikai analízise 3 nappal a fertőzés után (G). A vad és mutáns növényen számolt gyökérszőrgörbülés (I. fázis), infekciós fonál kezdemények (II. fázis) és kifejlett infekciós fonál (III. fázis). Az átlag és a ± SE (standard error) értékek N = 8 számú vad és mutáns növényből. A csillagok az oszlopdiagrammon a páros t-próbával kapott szignifikancia szintek: **P≤ 0,01 ***P≤ 0,001. A fertőzést követő 12. napon a bőrszövet és a kéregsejtek között felszaporodott baktériumok az *ief-1* mutánson (H). A mikroszkópos képek egész gyökérről (A, B, D, E) és metszetről (C, F és H). **Méretarány:** 50 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.



5.5. ábra: Növényi védekezési reakciók jelei az *ief-1* mutáns gümőben. A vad típusú gümőmetszet polifenolos festése 5 nappal a fertőzés után (A), illetve 21 nappal a rhizóbium (*S. medicae*) fertőzés után az *ief-1* mutánsról gyűjtött gümőmetszeteken (B). A polifenolok festése előtt a mutáns gümőmetszeten a GFP-vel jelölt baktériumok és a piros autofluoreszcencia detektálása (az ábrán nyílheggyel jelölve) (C). A kontroll gümőmetszeten nincs detektálható polifenolfelhalmozódás (A), míg a mutáns növényről származó gümőmetszeten a baktériumok mellett közvetlenül lévő sejtek polifenol-felhalmozódást mutatnak (B és C).
Méretarány: 50 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.

A fertőzést követő 3. héten a mutáns növények gümőjét konfokális mikroszkópiával vizsgálva is jól látszik, hogy a baktériumok továbbra is képtelenek a fejlődésben megrekedt gümő inváziójára (5.5. ábra /C), illetve a növényi sejtfalak enyhe autofluoreszcenciája is megfigyelhető. Ugyanazon gümő metszetének polifenolos festése jól mutatja a kék-zöldes elszíneződést a mutáns gümőn, amely a növényi védekezési reakciók beindulásának a jele. Ugyanebben fejlettségi állapotban lévő vad típusú gümők nem mutatják a polifenol felhalmozódást. Tekintettel arra, hogy a fertőzést követően először csak 12 nappal később detektáluk a barnás elszíneződést a mutáns növények gümőkezdeményeiben – azonban a mutáns fenotípus ennél jóval hamarabb keletkezik – feltételezhető, hogy a növényi védekezési reakciók csak az elakadt invázió és nem a mutáció közvetlen következménye.

5.2.2. Az *IEF* gén azonosítása és az *ief-1* mutáns genetikai komplementációja

Az *ief-1* mutáns növény genomjában az új-generációs szekvenálási módszerek segítségével 9 különböző inszerciós eseményt sikerült azonosítanunk (mellékletek 4. táblázat). Az inszerciók genomi pozícióit analizáltuk és olyan jelölt géneket kerestünk, amelyek felelősek lehetnek a mutáns fenotípus kialakításáért. Először azokat az inszerciókat analizáltuk, melyek génekben, vagy génközeli szabályozó régiókban helyezkedtek el, ezek a következő géneket érintették: Medtr1g087720, Medtr2g031750, Medtr4g040410, Medtr5g026290. A mutációt szenvedett gének expressziós profilját az elérhető RNS szekvenálási adatok (Breakspear et al., 2014;Roux et al., 2014), a *M. truncatula* génexpressziós atlasz https://mtgea.noble.org/v3/ és a *M.truncatula* „genom kereső" A17 r5.0 https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/ segítségével elemeztük. Emelett a gének által kódolt fehérjeszekvenciákban doménkereséseket végeztünk a feltételezett funkció megállapítására. A génexpressziós adatok analízise után három jelölt gén maradt, amelyek feltételezéseink szerint a szimbiotikus fenotípust okozhatták: egy aminosav transzporter, amely a kifejlett gümő nitrogénkötő zónájában mutat magas expressziót (Medtr2g031750), egy a gyökérben is expresszálódó, feltételezhetően az RNS molekulák érésében szerepet játszó gén (Medtr4g040410), és egy növényspecifikus DUF761 domént tartalmazó fehérjét kódoló gén, amely a rhizóbium és NF hatására indukálódik (Medtr1g087720).). Volt még egy negyedik, Medtr5g026290 gén is, ami nem indukálódott a szimbiotikus szövetekben és csak hipotetikus proteinnek prediktálták a programok, de a biztonság kedvéért ennek a mutációnak az öröklődését is ellenőriztük.

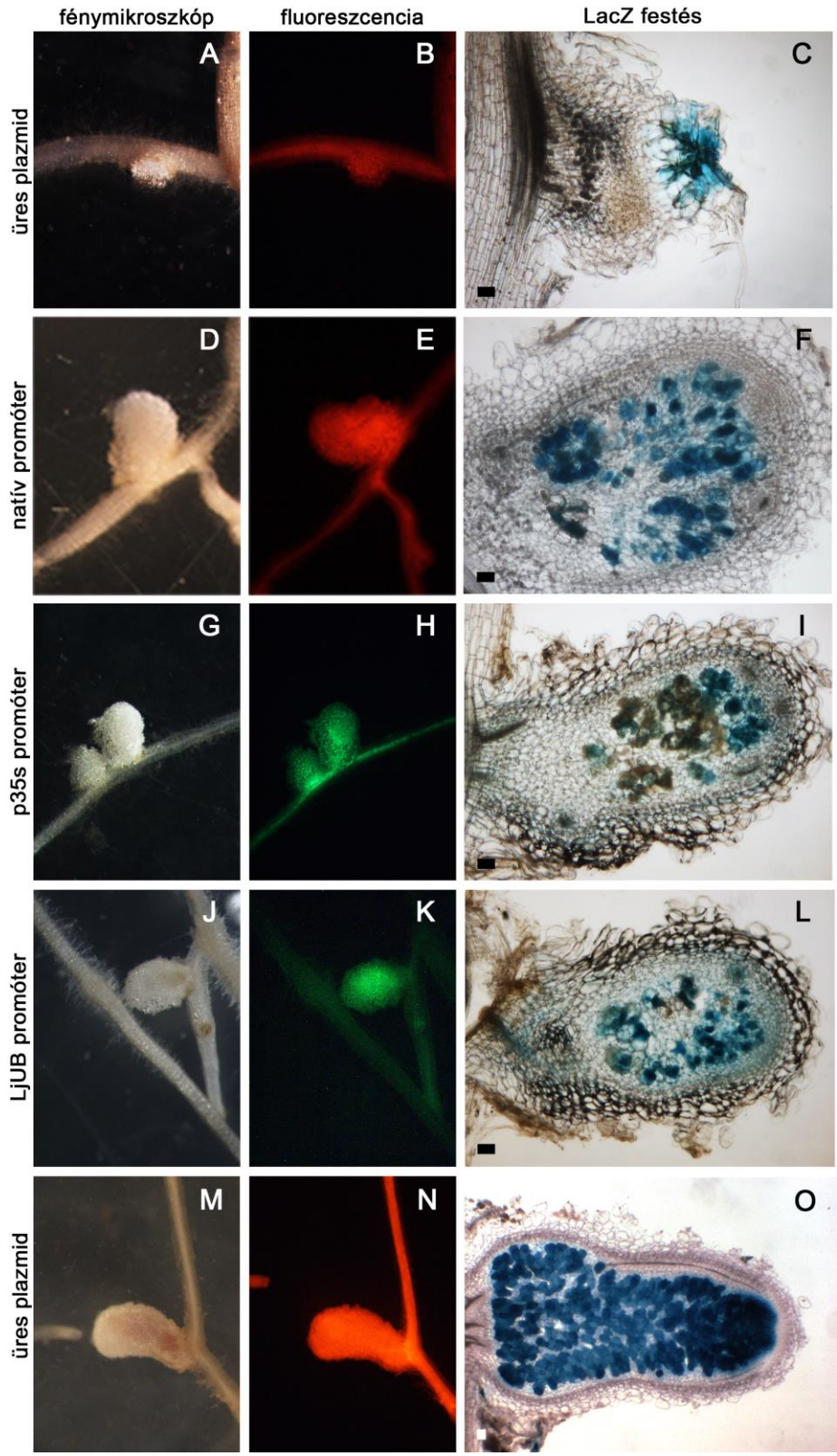
Annak eldöntésére, hogy melyik mutációs (inszerciós) esemény öröklődik a fenotípussal együtt, visszakeresztezett (Back Cross) szegregáló populáció F2 egyedeiből genomi DNS-t tisztítottunk és genotipizáltuk az egyedeket a mutációt hordozó génekre külön-külön tervezett primerekkel, amelyekkel különbséget tudunk tenni a mutáns és a vad allélek között. A vizsgált gének közül csak az egyik mutációjának öröklődése mutatott tökéletes koszegregációt a mutáns fenotípussal: az összes Fix^- egyed homozigóta volt a Medtr1g087720 inszerciós alléljára, illetve a Fix^+ egyedek mindegyike hordozott legalább egy vad allélt erre a génre nézve (a genotipizálás reprezentatív eredménye az 5.3. ábra /C panelen látható). A *Tnt1* inszerció a Medtr1g087720 gén kódoló régiójában, annak egyetlen exonjában található, 254 bázispárra a transzlációs start kodontól (5.7. ábra /A).

A szimbiotikus mutáns fenotípussal ko-szegregációt mutató gén azonosságának megerősítésére komplementációs kísérleteket végeztünk. Ehhez három különböző konstrukciót készítettünk. Az

egyik esetben a gén kódoló szakaszát az 1903 kb natív promóterével együtt klónoztuk. A másik két esetben a kódoló szakaszt az irodalomból jól ismert és jellemzett karfiol mozaik vírus (Cauliflower mosaic virus röviden CaMV) p35S, valamint a *L. japonicus Ubiquitin* gén (*LjUB*) promóterének az ellenőrzése alá vontuk. Mindkét promóter képes biztosítani a vizsgált gén folyamatosan magas szintű kifejeződését a növény gyakorlatilag összes szövetében. A konstrukciókat *Agrobacterium rhizogenes* közvetített gyökértranszformációval juttattuk az *ief-1* mutáns növény gyökerébe, negatív kontrollként pedig az üres vektoros kontrukciót használtuk. A transzgenikus növényekről, a *S. medicae* WSM419, *lacZ* riportergént hordozó baktériummal történt fertőzés után 3 héttel gümőket szedtünk a szimbiotikus fenotípus ellenőrzése céljából. A transzgenikus gyökereket minden esetben a konstrukcióval a növényben kifejeztetett fluoreszcens jel alapján (5.6. ábra /B, E, H, K és N) ellenőriztük és a gümők metszése után a baktériumokat β−galaktozidáz akitivitásra történő hisztokémiai festés segítségével tettük láthatóvá (5.6. ábra /C, F, I, L és O).

Az *ief-1* mutánson üres vektorral transzformált gyökereken csak a mutáns fenotípusra jellemző apró dudorokat, gümőkezdeményeket figyeltünk meg, amiket a baktériumok nem tudtak elárasztani (5.6. ábra /A, B és C), ezzel szemben a vad típusú növény az üres vektorral való transzformálás után az indeterminált gümőkre jellemző zónázottságot mutatott (5.6. ábra /M, N és O). Az üres vektoros konstrukcióval ellentétben a saját, a p35S és a p*LjUB* promóteres konstrukciókkal transzformált gyökereken fejlődő gümőkben a baktériumok inváziójat sikerült detektálnunk, azonban a komplementáló konstrukciók egyikével sem sikerült teljes komplementációt elérni (5.6. ábra/D-L).

Ezek az eredmények egyértelműen alátámasztották, hogy az általunk az *ief-1* vonalban megfigyelt szimbiotikus fenotípust a Medtr1g087720 gén hiánya okozza. Ezt a gént eddig nem hozták kapcsolatba a nitrogénkötő szimbiózissal, tehát sikerült egy új szimbiotikus gént azonosítanunk, amely fontos, meghatározó szerepet játszik a nitrogénkötő szimbiózis kialakításában. Bár a bakteriális inváziót sikerüt javítanunk a mutánsban, az jól látható a gümőképeken, hogy a komplementált gümők nem teljes mértékben nyerték vissza működőképességüket.

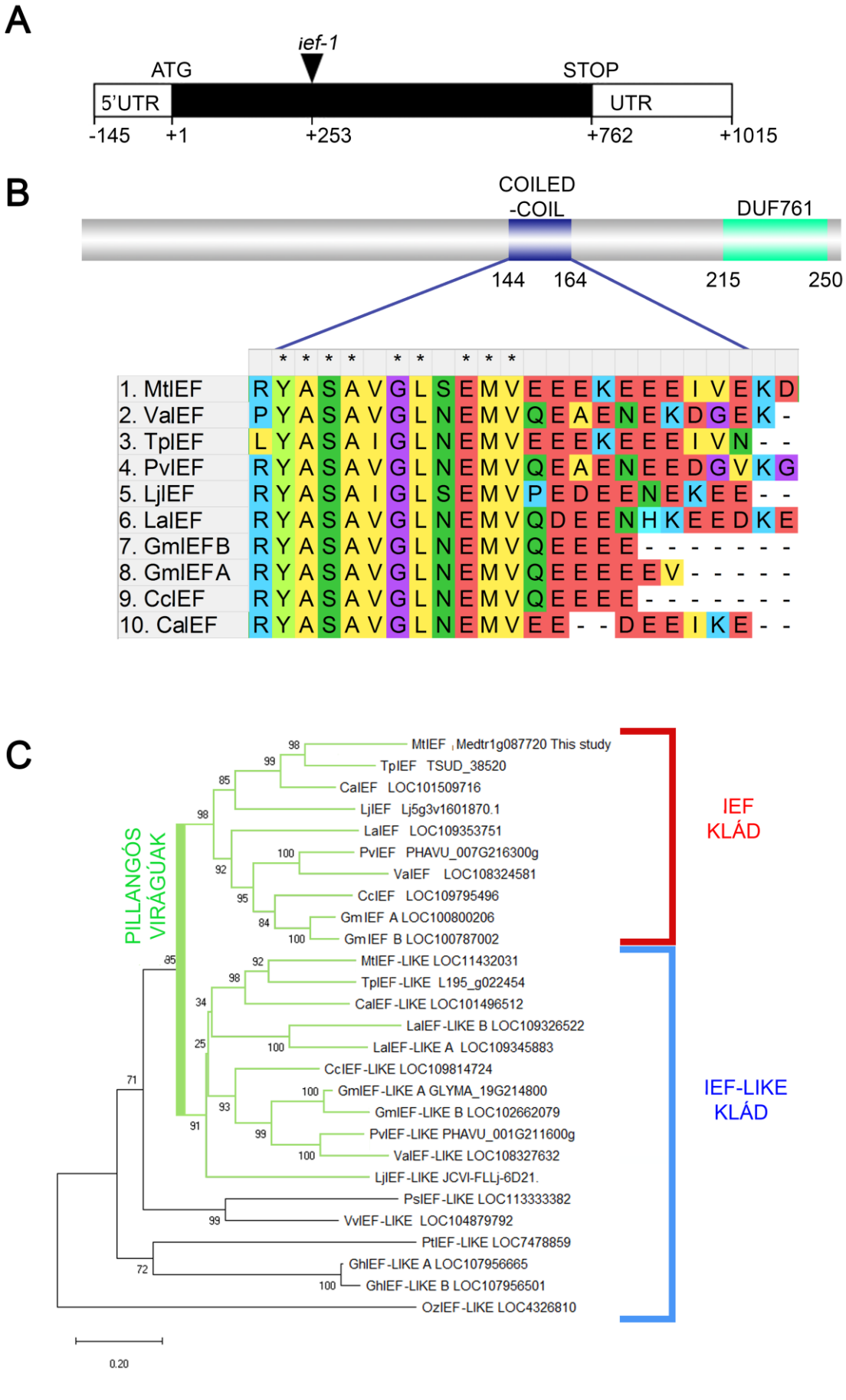


5.6. ábra: Az *ief-1* mutáns gümőfenotípusának menekítése az *MtIEF* gén bevitelével. A mutáns (A-C) és a vad típusú kontroll (M-O) gümők fenotípusa az üres vektorral transzformált gyökereken. Az *ief-1* mutáns gümőfenotípusának komplementálása a *pMtIEF::MtIEF* (saját promóterrel meghajtott *MtIEF*) (D-F), és a konstitutív promóter *p35S::MtIEF* (G-I) és *pLjUB::MtIEF* (J-L) konstrukciókkal. Egész gyökérről készült képek (A, B, D, E, G, H, J, K, M és N), illetve gümőmetszetek képei (C, F, I, L és O). A p35S a Cauliflower mosaic virus (CaMV), a LjUB pedig a *L. Japonicus* Ubiquitin génjének promótere.
Méretarány: 50 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.

5.2.3. Az IEF fehérje doménszerkezetének, rokonsági viszonyainak és lokalizációjának vizsgálata

Az *IEF* gén (5.7. ábra /A) által kódolt 28 kDa nagyságú fehérje az NCBI predikciós programja alapján (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) egy DUF761 domént hordoz a fehérje C-terminális részén (5.7. ábra /B). A DUF elnevezés az angol „domain of unknown function" rövidítése, tehát a fehérje rendelkezik egy növényspecifikus doménnel, aminek nem ismert a funkciója. Különböző predikciós programokkal vizsgáltuk az IEF fehérjeszekvenciáját, de sem transzmembrán domént (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), sem pedig szignál peptid motívumot (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) nem találtunk a feltételezhetően globuláris szerkezetű fehérjében. Emellett egy coiled-coil motívumot sikerült azonosítanunk (https://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html) a fehérjeszekvencián (5.7. ábra /B).

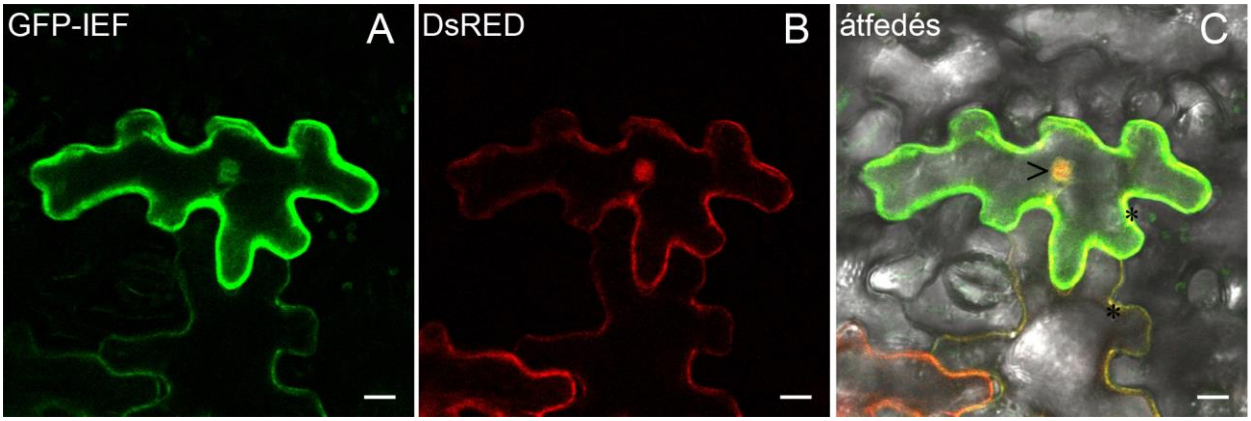
Az NCBI adatbázis alapján a fehérjeszekvencia segítsével számos homológot azonosítottunk, ami alapján az IEF fehérje egy pillangósvirágú növényekre specifikus család tagja (5.7. ábra /C). Sikerült azonosítanunk a *M. truncatula* genomon belül az *IEF* gén egy közeli homológját, amit *MtIEF-LIKE* génnek neveztünk el (a Medtr7g109300 gén által kódolt fehérje 38%-os azonosságot mutat az IEF fehérjével). A pillangósvirágúak monofiletikus kládján kívül kizárólag az MtIEF-LIKE fehérjéhez találtunk homológokat. Ez alapján feltételezhető, hogy a nitrogénkötő szimbiózis kialakulása során az ősi pillangósvirágú növényben az *MtIEF-LIKE* gén duplikációjával jött létre az *IEF* gén, majd egy új, szimbiotikus funkciót nyert. A DUF761 domén az összes IEF és IEF-LIKE homológon megtalálható, míg a coiled-coil régió specifikus az IEF és IEF homológ fehérjékre (5.7. ábra /B). A motívum elején található egy 11 aminosav hosszú konzervált szakasz, amit egy savas aminosav tartalmú, elsősorban glumaminsavat (E vagy Glu) tartalmazó rész követ. Ez a konzervált régió az IEF-LIKE pillangósvirágú kládon belüli is megtalálható, de a savas aminosavakat tartalmazó rész már itt is hiányzik (2-3 glutaminsav található az azonos hosszúságú régióban). A savas aminosavak jelenléte fontos a coiled-coiled motívum predikciójához, mert akár csak egyetlen savas aminosav hidrofób alaninra történő cseréjével a coiled-coil motívum predikciója eltűnik. A coiled-coil motívum rendszerint fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásában játszik fontos szerepet (Lupas and Gruber, 2005;Mier et al., 2017), míg más esetekben transzkripciós faktorokban DNS-kötő funkciót látnak el (Truebestein and Leonard, 2016).


A
ief-1
ATG
STOP
5'UTR
UTR
-145
+1
+253
+762
+1015
B
COILED
-COIL
DUF761
144
164
215
250
1. MtIEF RYASAVGLSEMVEEEKEEEIVEKD
2. VaIEF PYASAVGLNEMVQEAENEKDGEK-
3. TpIEF LYASAIGLNEMVEEEKEEEIVN--
4. PvIEF RYASAVGLNEMVQEAENEEDGVKG
5. LjIEF RYASAIGLSEMVPEDEENEKEE--
6. LaIEF RYASAVGLNEMVQDEENHKEEDKE
7. GmIEFB RYASAVGLNEMVQEEEE-----
8. GmIEFA RYASAVGLNEMVQEEEEEV----
9. CcIEF RYASAVGLNEMVQEEEE-----
10. CaIEF RYASAVGLNEMVEE--DEEIKE--
C
MtIEF ,Medtr1g087720 This study
TpIEF TSUD_38520
CaIEF LOC101509716
LjIEF Lj5g3v1601870.1
LaIEF LOC109353751
PvIEF PHAVU_007G216300g
VaIEF LOC108324581
CcIEF LOC109795496
GmIEF A LOC100800206
GmIEF B LOC100787002
MtIEF-LIKE LOC11432031
TpIEF-LIKE L195_g022454
CaIEF-LIKE LOC101496512
LaIEF-LIKE B LOC109326522
LaIEF-LIKE A LOC109345883
CcIEF-LIKE LOC109814724
GmIEF-LIKE A GLYMA_19G214800
GmIEF-LIKE B LOC102662079
PvIEF-LIKE PHAVU_001G211600g
VaIEF-LIKE LOC108327632
LjIEF-LIKE JCVI-FLLj-6D21.
PsIEF-LIKE LOC113333382
VvIEF-LIKE LOC104879792
PtIEF-LIKE LOC7478859
GhIEF-LIKE A LOC107956665
GhIEF-LIKE B LOC107956501
OzIEF-LIKE LOC4326810
PILLANGÓS VIRÁGÚAK
IEF KLÁD
IEF-LIKE KLÁD
0.20

5.7. ábra. Az *MtIEF* a pillangósvirágúakra specifikus fehérjét kódol. A Medtr1g087720 (*MtIEF*) gén sematikus szerkezete (A) és a kódolt fehérje domén összetétele (B). A *Tnt1* inszerció helyét az *ief-1* mutáns allélban nyílheggyel jelöltem (A). A kisméretű prediktált MtIEF fehérje konzervált coiled-coil régiójának illesztése a legközelebbi homológ szekvenciáik felhasználásával (B). Az MtIEF fehérje és homológjainak filogenetikai analízise (C). A fehérje szekvenciák NCBI adatbázisból lettek azonosítva hasonlósági keresések eredményeként. A fehérje szekvenciák illesztése ClustelW program segítségével történt, a filogenetikai fa a MEGA-X szoftver segítségével készült a Neighbor-joining módszer segítségével, a „bootstrap" érték: 2000. (Mt) *M. truncatula*, (Tp) *Trifolium pratense*, (Ca) *Cicer arientum*, (La) *Lupinus angustifolius*, (Cc) *Cajanus cajan*, (Gm) *Glycine max*, (Pv) *Phaseolus vulgaris*, (Va) *Vigna angularis*, (Lj) *L. japonicus*, (Ps) *Papaver somniferum*, (Vv) *Vitis vinifera*, (Pt) *Populus trichocarpa*, (Gh) *Gossypium hirsutum* és (Oz) *Oryza sativa*.

Az IEF sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához egy CaMV 35S promóterrel meghajtott folyamatosan aktív és túltermelő konstrukciót hoztunk létre, ahol az IEF protein a GFP fluoreszcens fehérjével fúzionálva (GFP-IEF) képződik és ezzel a konstrukcióval végeztünk komplementációs kísérleteket az 5.2.2 fejezetben leírtakhoz hasonlóan. Az 5.6. ábrán látható részleges komplementációhoz hasonló eredményt kaptunk, tehát a GFP fehérjével fúzionáltatva is funkcióképes az IEF fehérje, azonban a fúziós fehérje sejten belüli lokalizációját nem tudtuk detektálni transzgenikus *M. truncatula* gyökérsejtekben. Az IEF sejten belüli lokalizációnak megállapítására ezért *Nicotiana benthamiana* levelekben tranziensen fejeztettük ki ugyanezt a konstrukciót (p35S::GFP-IEF) és vizsgáltuk a fluoreszcens fúziós fehérje sejten belüli lokalizációját. Ebben a heterológ növényi rendszerben gyengébb fluoreszcens jelet a sejtmagban és erősebbet a sejtmagon kívül azonosítottunk (5.8. ábra /A). A vektorról termelődő szabad DsRED fluoreszcens fehérjét használtuk lokalizációs kontrollnak, ami határozott sejtmagi és citoplazmatikus lokalizációt is mutat (5.8. ábra /B). Az IEF fehérje ko-lokalizációt mutat a szabad DsRED fehérjével, ami alapján kijelenthető, hogy az IEF erős citoplazmatikus és gyenge sejtmagi lokalizációt mutat. Az IEF fehérje prediktált molekula súlya 28.7 kilodalton (kDa), a GFP-vel fúzionáltatva is még 60 kDa alatti. Ismeretes, hogy a 60 kDa alatti globuláris fehérjék szabadon mozoghatnak a citoplazma és a sejtmag között (Gorlich, 1998), ahogy azt a szabad DsRED is teszi, és ezért mutat ugyanolyan erős jelet a sejtmagban és a citoplazmában. Ezzel szemben, az IEF fehérje erős citoplazmatikus feldúsulást mutat ebben a rendszerben. Éppen ezért az IEF és IEF homológ fehérjeszekvenciákon kerestünk olyan szekvencia motívumokat, amelyek magyarázhatják a fehérje sejten belüli lokalizációs mintázatát. Elsősorban nukleáris lokalizációs szignált (NLS) és nukleáris export szignált (NES) kerestünk. A vizsgált tíz IEF homológból hatban találtunk is egy NES szignál motívumot (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/ predikciós programot használtuk), mégpedig a DUF761 doménben. A *M. truncatula* IEF is azon négy fehérje csoportjába tartozik, amelyen épphogy a „küszöbérték" alatt volt a predikció

valószínűsége, tehát ezek alapján gyenge és bizonytalan valószínűségű a NES szignál megléte, viszont a kísérleti eredmény arra utal, hogy lehet ilyen funkciója.



5.8. ábra: Az IEF fehérje sejten belüli lokalizációja *N. benthamiana* levelekben. A GFP-IEF fehérje lokalizációja (A), a szabad DsRED lokalizációja (B), illetve a GFP-IEF és DsRED átfedő képe (C). A szabad DsRED egyöntetű citoplazmatikus és sejtmagi lokalizációja átfed a GFP-IEF lokalizációjával (C). A sejtmagot nyílheggyel, a citoplazmát csillaggal jelöltük. **Méretarány:** 10 μm.

A fenti eredmények alapján elmondható, hogy az *IEF* egy kizárólag a pillangósvirágúakban előforduló, feltehetően az *IEF-LIKE* génből duplikációval kialakult gén. A gén által kódolt fehérjén található egy konzervált régió a C-terminálison a DUF761 doménben (NES), ami elősegítheti a fehérje magból történő exportját. Emellett a fehérjén található, az IEF homológokra specifikus coiled-coil régió is.

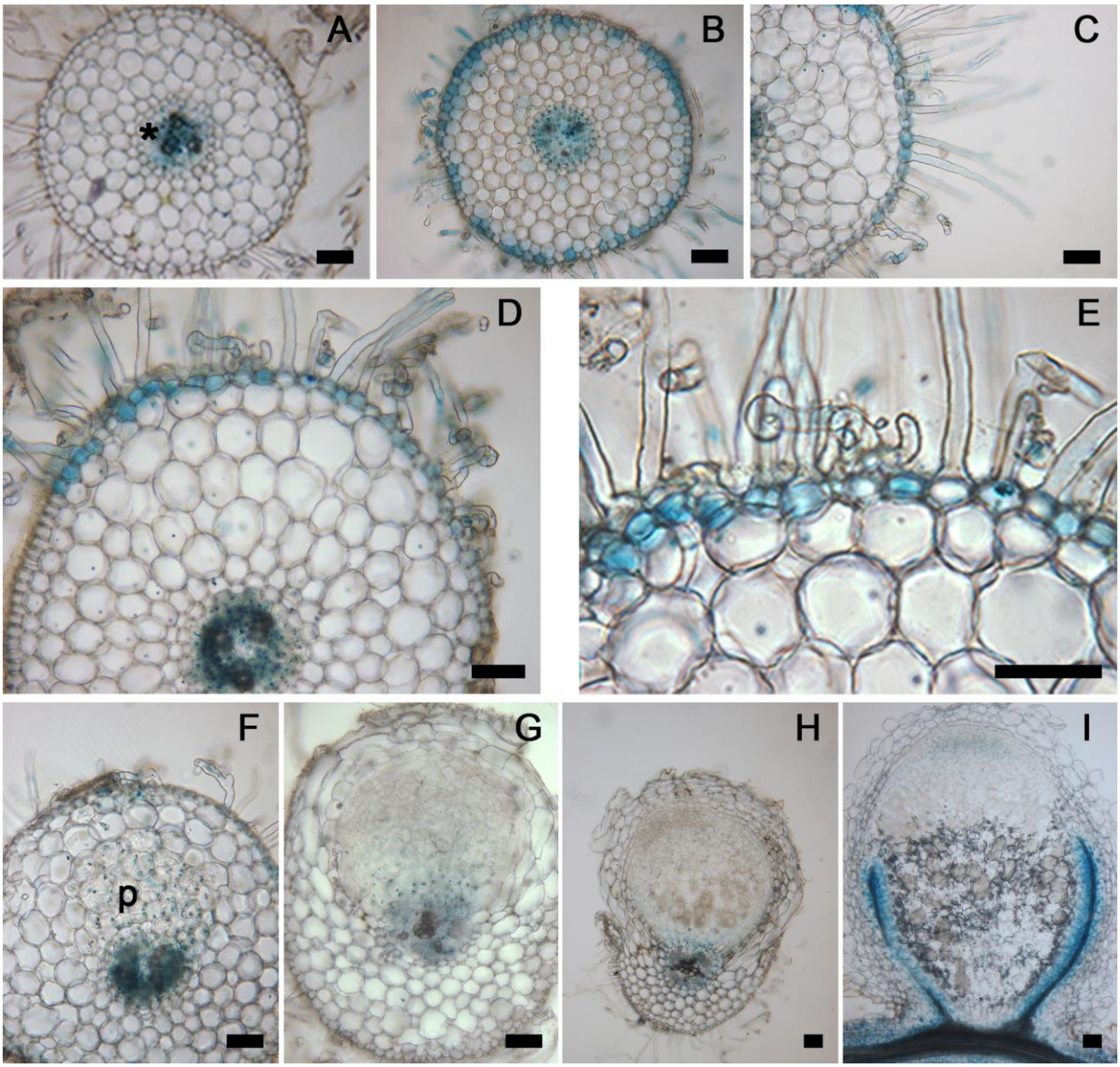
5.2.4. Az *IEF* gén expressziójának vizsgálata

Az *IEF* expressziójának vizsgálatát a már meglévő kísérleti eredmények összegyűjtésével kezdtük. A *M. truncatula* számos génjének expressziós adatait tartalmazó, fentebb már említett MtGEA génexpressziós atlasz (Affymetrix chipen végzett hibridizációs) adatainak elemzésévével kezdtük. Megnéztük az *IEF* és *IEF-LIKE* gének kifejeződését az elérhető összes szövetben és kezelés hatására (melléklet 5. ábra.). Az MtGEA adatbázisa alapján mindkét gén magas expressziót mutat az érett virágból származó mintákban, de kizárólag az *IEF* gén expressziója 2.89-szeresésre nő meg Nod-faktor (NF) kezelés hatására a gyökérszőrökben a kontroll kezeléshez képest (Breakspear et al., 2014). Egy másik laboratóriumban az NF kezelést követően expressziós analizíst végeztek (RNS szekvenálással), ahol kizárólag a gyökérszőröket használták mintának (Damiani et al., 2016), és itt is az *IEF* gén indukcióját figyelték meg (a NF kezelést követően expressziója 1.57-szorosára nőtt). Mindkét kísérleti rendszerben a kimutatott *MtIEF* expresszió szintje alacsonynak mondható, közel a technikák hibahatárához. Egy másik, az érett gümő különböző zónáiból származó minták RNS szekvenálási adatainak elemzését is elvégeztük (Roux et al., 2014), azonban ezek az adatok sem erősítették meg, hogy az *IEF* gén egyértelműen aktiválódna a gümőben. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az *IEF* gén az NF érzékelését követőn bizonyos szinten, rövid ideig és limitált helyen aktiválódhat, míg a szimbiózis későbbi szakaszában feltételezhetően inaktiválódik, vagy csak a detekciós szint határán fejeződik ki.

Azért, hogy pontosabban nyomon követhessük az *IEF* kifejeződését a szimbiózis kialakulása során, promóter analízis kísérleteket végeztünk. Ehhez a komplementálási kísérletekben is használt natív *IEF* promóter szakaszt (5.6. ábra D-F) és a *GUS* riporter gént fúzionáltattuk egymással és ennek segítségével vizsgáltuk az *IEF* gén promóteraktivitását a szimbiotikus interakció során. A konstrukciót vad típusú növénybe jutattuk *A. rhizogenes* közvetített gyökértranszformáció segítségével, a transzgenikus gyökereket a konstrukción lévő DsRED riportergén segítségével ellenőriztük.

Baktériummal történő fertőzés előtt promóteraktivitást csak a gyökér vaszkuláris szövetei mutatnak (5.9. ábra /A, a gyökérkeresztmetszetet a gyökér, rhizóbium szimbiotikus kölcsönhatásra fogékony zónájából készítettük). A rhizóbium fertőzést követő második napon egyértelmű indukciót figyeltünk meg a gyökér NF-ra fogékony zónájában lévő gyökérszőrőkben (5.9. ábra /C) és ez az aktivitás fennmaradt a fertőzést követő harmadik napon is, ahol már egyértelműen látszódnak a pásztorbot szerűen görbült gyökérszörök is, ami egyértelmű jele a

baktériumok megtapadásának (5.9. ábra /D és E). A promóteraktivitás nem az összes gyökérszőrre terjed ki, csak egy félhold alakú sávban figyelhető meg. A fertőzést követő negyedik napon, amikor a gümő fejlődésnek indul (primordium formálódik), az *IEF* promóteraktivitása szinte teljesen megszűnik, nemcsak a gümőprimordiumban, de a korábban kéken festődő epidermisz sejtekből is eltűnt (5.9. ábra /F). A gümőfejlődés későbbi szakaszában, a fertőzést követő ötödik (5.9. ábra /G) és hatodik (5.9. ábra/H) napon sem figyeltünk meg promóteraktivitást. Az érett gümőben csak igen alacsony szintű aktivitás mutatható ki a merisztémában, illetve a gyökér vaszkuláris szövetéhez hasonló aktivitást figyeltünk meg a gümő saját vaszkuláris rendszerében (5.9. ábra /I). Az *IEF* promóteraktivitása a gümőfejlődés beindulását követően a fogékony zónában lévő gyökérszőrökben sem detektálható, ami alapján feltételezhető, hogy az *IEF* az autoregulációs szabályozás alatt áll. Az RNS szekvenálásból származó adatok alapján az NF kezelés önmagában is elég az *IEF* indukciójához, ezért a szimbionta partner által termelt NF tartalmú steril extraktummal is kezeltük a *pIEF::GUS* konstrukcióval transzformált növényeket. A rhizóbium baktériumra adott válasznál jóval erősebb, de szintén epidermisz-specifikus indukciót figyelhetünk meg, amely megegyezik az RNS szekvenálási adatokkal (5.9. ábra /B). A baktériumra adott választól eltérően ebben az esetben az összes epidermisz sejtben megfigyelhetjük az *IEF* indukcióját.



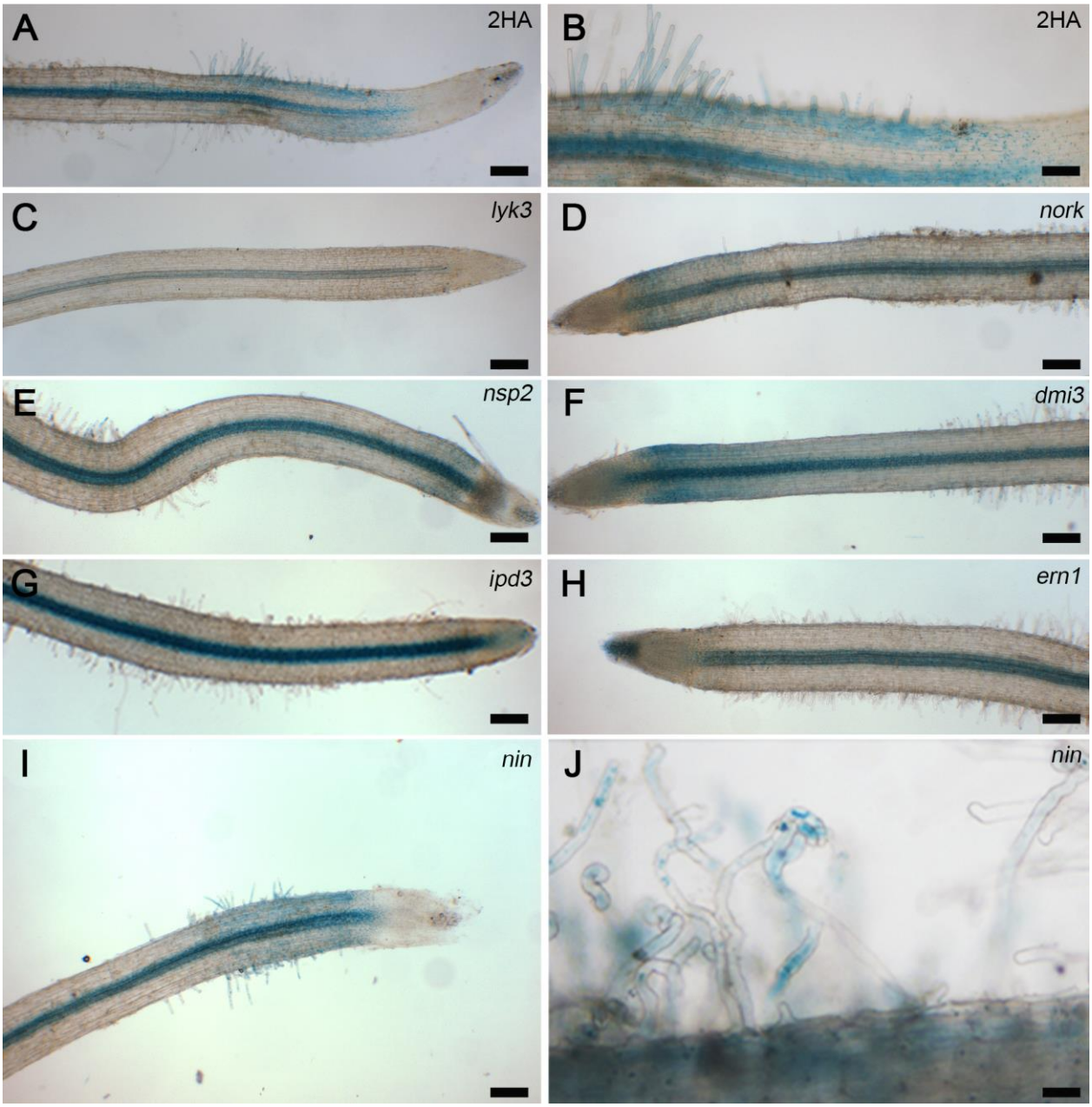
5.9. ábra. Az *MtIEF* gén kifejeződésének a vizsgálata az 1903 bp natív *IEF* promóter-GUS riporter konstrukció segítségével 2HA vad típusú növényben. Gyökér keresztmetszet a szimbiotikus fogékony zónából fertőzés előtt (A), fertőzést követő 2. napon (C), 3. napon (D és E), illetve 24 órával az NF kezelést követően (B). A fejlődésnek induló gümőprimordium (F), 4 napos (G) és 6 napos (H) keresztmetszeti képek és 14 napos teljesen kifejlett gümő hosszmetszeti képe (I) rhizóbium fertőzés után. A rhizóbium fertőzést megelőzően látható GUS alapaktivtás a gyökér (A) és az érett gümő vaszkuláris szövetében (I). Epidermisz specifikus indukció NF-al történő kezelést követően (B), illetve a rhizóbium fertőzést kővető 2. (C) és 3. (D és E) napon. Görbült gyökérszőrök a fertőzést követő 3. napon (D és E). Jelölések; *: vaszkuláris szövet, p: primordium
Méretarány: 50 μm, **Metszetvastagság:** 60 μm.

5.2.5. Az *IEF* gén funkciójának vizsgálata az NF szignálútban

Eredményeink alapján megállapíthattuk, hogy az *IEF* gén a szimbiózis korai szakaszában indukálódik és a baktérium által termelt NF is képes aktiválni, ami alapján feltételezhetően az *IEF* gén az NF jelátviteli út eddig még nem ismert, új eleme. Felmerült azonban a kérdés, hogy az *IEF* gén pontosan hol helyezkedik el a szignálútban a már azonosított szimbiotikus génekhez képest.

5.2.5.1. Az *IEF* gén kifejeződésének vizsgálata ismert szimbiotikus mutánsokban

Az *IEF* gén az NF szignálútvonalban elfoglalt helyének megállapítására a *pIEF::GUS* riporter konstrukciót különböző, a szignálút egyes elemeiben mutáns növényekbe transzformáltuk, melyekről ismert a jelátvitelben betöltött szerepük. Ezt követően, NF tartalmú extraktummal 24 óráig inkubáltuk a transzgenikus gyökereket és megvizsgáltuk az *IEF* promóter aktivitását. A szignálútvonalat az alabbi génekben mutáns növényeken keresztül vizsgáltuk: a *LYK3, NORK* receptor kinázok, *NSP2, IPD3, ERN1* és *NIN* transzkripciós faktorok és regulátorok, illetve a központi szerepet játszó *DMI3* kináz. Az *IEF* gén NF-függő indukcióját az 5.10. ábra mutatja a különböző mutánsokban. A vad típusú 2HA növényben jól látható az *IEF* gén epidermisz-specifikus indukciója az NF tartalmú extraktummal történő kezelés után (5.10. ábra /A és B). Ezzel szemben a *lyk3* (5.10. ábra /C), a *nork* (5.10. ábra /D), az *nsp2* (5.10. ábra /E), a *dmi3* (5.10. ábra /F), az *ipd3* (5.10. ábra /G) és az *ern1* (5.10. ábra /H) mutáns növényekben nem kaptunk a vad típusra jellemző GUS festődést az epidermiszben. Ez arra enged következtetni, hogy az *IEF* gén a szignálútvonalban az *ERN1* transzkripciós faktor alatt helyezkedik el (lásd 2.5 ábra). Az *ERN1* aktivitása az NSP1/NSP2 és IPD3/DMI3 komplexektől függ (2.6 ábra), éppen ezért nem meglepő, hogy az *IEF* ezekben a génekben mutáns növényekben sem indukálódik. Ezzel szemben a *nin* mutáns növényben a vad típushoz hasonló *IEF* indukciót figyeltünk meg NF kezelés hatására (5.10. ábra /I), és a rhizóbium baktériummal történő fertőzést követő 3. napon is (5.10 ábra /J). Az *IEF* aktivitása tehát független a NIN transzkripciós faktor jelenlététől. Az ERN1 transzkripciós faktor ugyanakkor nem biztos, hogy közvetlenül felelős az *IEF* transzkripcionális szabályozásáért. Elképzelhető, hogy egy még nem azonosított faktoron keresztül az ERN1 közvetve játszik szabályozó szerepet az *IEF* működésében.



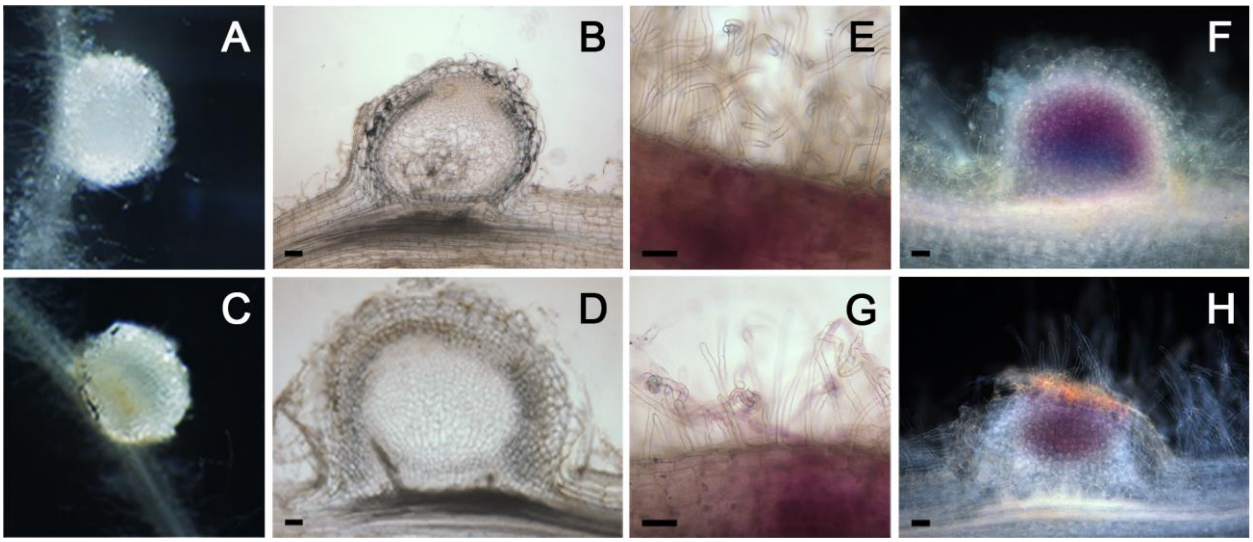
5.10. ábra Az *MtIEF* promóteraktivitása vad típusú (2HA), illetve szimbiotikus mutáns növények gyökereiben. A képek a *pMtIEF::GUS* transzgenikus gyökerekről készültek 24 órás NF kezelést követően (A-I), vagy 3 nappal a rhizóbium fertőzés után (J). A képek 2HA vad típusú (A és B), *lyk3-1* (C), *nork-1* (D), *nsp2-2* (E), *dmi3-1* (F), *ipd3-1* (G), *bit-1* (H) és *nin-1* (I és J) mutáns növényekről készültek. **Méretarány:** 200 μm (A, C-I), 80 μm (B) és 40 μm (J).

5.2.5.2. A gümőorganogenezis indukciója és az *ENOD11* kifejeződés vizsgálata az *ief-1* mutánsban

A bevezető részben ismertettem, hogy a DMI3 a gümőfejlődés egyik központi kulcsszabályozója (mesterregulátora) és a szabályozó doménjeitől megfosztott auotoaktív DMI3 kináz rhizóbium mentes körülmények között is képes beindítani a gümőfejlődés programját (ún. spontán gümőképződés aktiválódása, (Gleason et al., 2006b)). Az autoaktív DMI3 irányította spontán gümőzési teszt alkalmas arra, hogy meghatározzuk a szimbiotikus gének DMI3-hoz viszonyított helyét az NF szignálútvonalban, azon belül is a gümőfejlődés folyamatában (Hayashi et al., 2010). A NIN (Marsh et al., 2007) és az ERN1 (Middleton et al., 2007) transzkripciós faktorok szerepére például egyaránt szükség van az infekcióhoz és a gümőfejlődés programjának beindításához is, ezért is helyezkednek el a központi útvonalban (2.6. ábra). Az *IEF* kizárólag az epidermiszben mutat indukciót, felvetődött tehát a kérdés, hogy vajon szükség van-e a szerepére közvetlenül a gümőképződés folyamatához. Ennek a kérdésnek a megválaszolására az autoaktív $DMI3^{1-311}$ (csak a kináz domént tartalmazó forma) fehérjét vad típusú és *ief-1* mutáns növényekben termeltettük túl, majd hét héttel a transzformálás után megvizsgáltuk a transzgenikus gyökereket. A növényeket végig rhizóbium mentes körülmények között neveltük. A vad típusban és az *ief-1* mutánsban is a spontán gümőkre jellemző kerek gümőszerű struktúrákat találtunk (5.11. ábra).

Megvizsgáltuk az *ENOD11* szimbiózis-specifikus markergén rhizobium által történő aktivitását is vad típusú és *ief-1* mutáns növényekben. Az *ENOD11* az NSP1/NSP2 komplex és ERN1 által szabályozódik és aktivitást mutat az epidermiszben és a kéregsejtekben egyaránt. Az *ENOD11* aktivitását tesztelve tovább vizsgálhatjuk az NF szignalizációs útvonal érintettségét az *ief-1* mutánsban. Ehhez *pENOD11::GUS* promóter riporter konstrukcióval transzformáltuk a gyökéreket. Az *ENOD11* korai nodulációs gén, amely az NSP1/NSP2 és ERN1 transzkripciós faktorok által indukálódik (Cerri et al., 2012) és széleskörben használt marker az NF szignálútvonal integritásának vizsgálatára különböző mutánsokban. A *ief-1* mutánsban a fertőzést követő 3. (5.11. ábra /G) és 6. napon (5.11. ábra /H) a vad típushoz hasonló indukciót figyeltünk meg (5.11. ábra /E és F), ami alapján az *IEF* hiánya nem befolyásolja sem a kortexben sem a gümőben az NSP1/NSP2 és ERN1 mediált útvonalakat.

A spontán gümőzési teszt kísérlet eredménye és *pENOD11* promóteraktivitás vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy az *IEF* nem játszik szerepet a gümőképződés folyamatában.



5.11. ábra: Az *MtIEF* nem szükséges a gümőképződés programjához az autoaktív DMI3 függő spontán gümőzési teszt (A-D) és a rhizóbium indukálta *pENOD11* aktivitás (E-H) alapján. A minták 2HA vad (A, B, E és F), illetve az *ief-1* mutáns (C, D, G és H) növényekből származnak. A spontán gümőzési teszt az autoaktív DMI3 konstrukcióval történő transzformálást követő 6-7. hétben lett kiértékelve. A *pENOD11* aktivitást a fertőzést követő 3. (E és G), 5. (F) és 6. napon (H) teszteltük. A transzgenikus gyökereket pENOD11 (magenta) és a baktérium jelenlétére (kék) is festettük GUS-LacZ kettős festés segítségével (R, F, G és H). **Méretarány:** 50 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.

5.2.6. Az IEF fehérje interakciós partnereinek keresése

Az IEF fehérjében található coiled-coil régió feltételezhetően fehérje kölcsönhatások kialakításában vesz részt (Lupas and Gruber, 2005;Mier et al., 2017), ezért élesztő-két hibrid (angolul yeast two hybrid, röviden Y2H) kísérletekben fehérje kölcsönhatási vizsgálatokat végeztünk már ismert szimbiotikus fehérjékkel. Az *ief-1* mutáns szimbiotikus fenotípusa alapján az infekció folyamatában hasonló szinten lévő, a NOD-faktor szignálút eddig azonosított elemeit választottuk ki.

A következő jelöltekkel vizsgáltuk a kölcsönhatást a Y2H-ben: a LYK3, NFP és NORK receptor kinázok, melyeknek intracelluláris doménjeit (IC) használtuk; illetve az NSP1, NSP2, IPD3, DMI3, LIN és RPG fehérjék. Vizsgálatainkba bevontuk a még nem publikált, de laborunkban vizsgált és a szimbiotikus interakcióban szerepet játszó MtUSA és MtUSA2 E3 ubiquitin ligázokat is, melyek a NORK receptorral mutatnak interakciót és így feltételezhetően a szimbiotikus interakció korai szakaszában játszanak szabályozó szerepet.

Nem találtunk kölcsönhatást az IEF és a LYK3-IC, NFP-IC, NORK-IC, NSP1, NSP2, IPD3, DMI3, LIN, MtUSA és MtUSA2 fehérjék között (melléklet 1-4. ábra). Ezzel szemben az RPG kölcsönhatott ebben a kísérleti rendszerben az IEF fehérjével (5.12. ábra /A). Megvizsgáltuk, vajon a két fehérje kölcsönhat-e saját magával (homodimerizáció), illetve mutat-e autoaktivitást ebben a rendszerben, de a Y2H-ban ilyen funkciókat nem láttunk (5.12. ábra /A).

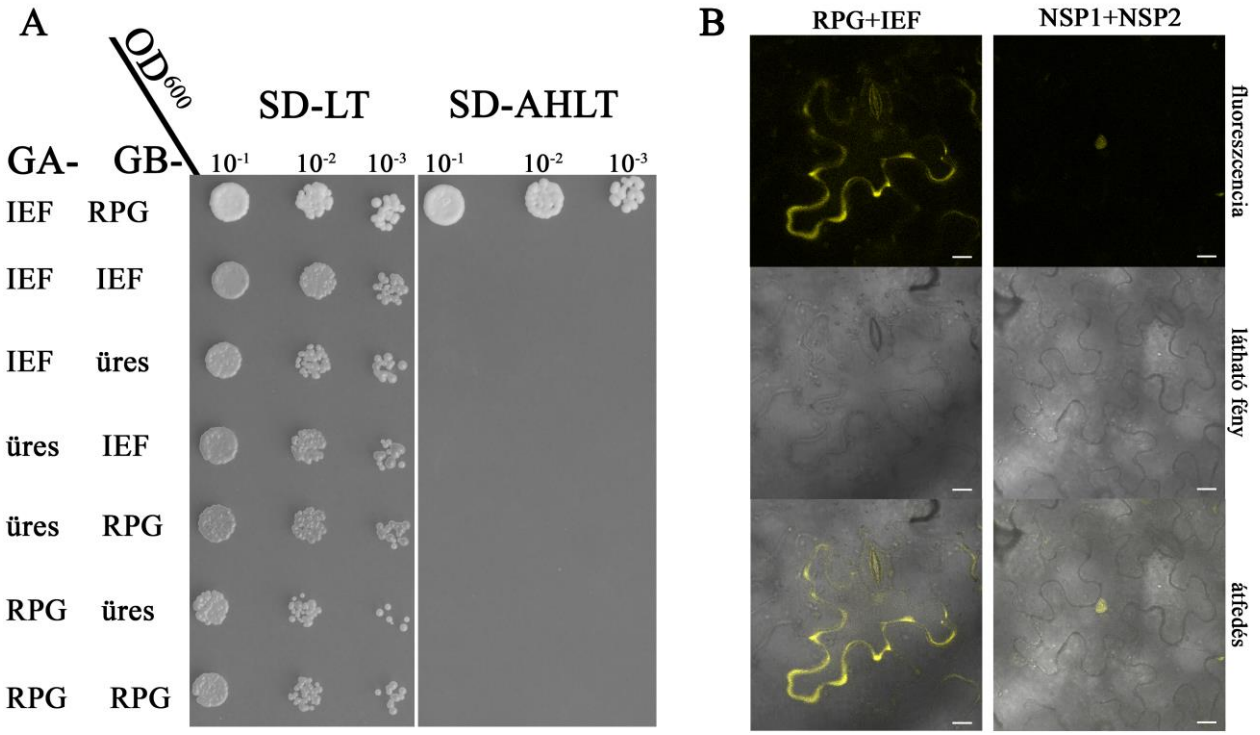
Az RPG-IEF fehérje kölcsönhatást egy *in vivo* növényi rendszerben is megvizsgáltuk, a két molekulás komplementációs kísérleti rendszer segítségével (Bimolecular fluorescence complementation röviden BiFC). Az RPG fehérjét a sárgán fluoreszkáló (yellow fluorescence protein röviden YFP) fehérje egyik, míg az IEF fehérjét a YFP másik részével fúzionáltattuk és ezt a két rekombináns fehérjét dohány *N. benthamiana* levelében együtt fejeztettük ki. Pozitív kontrollként két már jól ismert kölcsönható partnert, az NSP1 és NSP2 fehérjéket is bevontunk a vizsgálatainkba. Ebben a rendszerben akkor kapunk fluoreszcens YFP jelet, ha az általunk vizsgált két fehérje kölcsönhat egymással, ekkor a fluoreszcens fehérje funkciója helyreáll. Az eredményeink megerősitették, hogy a két szimbiotikus fehérje kölcsönhat egymással (5.12. ábra /B).

Az *rpg* mutáns növény szimbiotikus fenotípusa szinte teljes egészében megegyezik az *ief* fenotípusával. Az *rpg* mutáns növényben, akárcsak az *ief* mutánsban, a gyökérszőr pásztorbot-szerű görbülése és a baktériumok csapdázása rendben megtörténik, de az ezt követően az infekciós fonalak fejlődése már nem vagy csak abnormálisan figyelhető meg. Az *rpg* mutánsban

is az 5.4. ábra /H képen látható módon, az abortált infekciós fonalak végén ballonszerű struktúra kialakulását figyelhettük meg az *ief* mutánshoz hasonlóan. Érdekes módon az RPG fehérje is egy coiled-coil motívumokat tartalmazó fehérje, és a sejten belüli lokalizációja is hasonló az IEF fehérjével *N. benthamiana* levélben (Arrighi et al., 2008).

Az RPG fehérje funkciója szintén nem ismert. Az RPG fehérje szekvenciájának elemzése különböző domén predikciós programok segítségével az IEF fehérjéhez hasonlóan nem talált a funkcióra utaló fehérje domént. Az IEF fehérjéhez hasonlóan ez is csak a pillangós-virágú növényekre jellemző, ami arra enged következtetni, hogy specifikusan a nitrogénkötő szimbiózis kialakulásában játszik szerepet.

Megállapíthatjuk tehát, hogy mindkét gén az NF szignálútban vesz részt, fehérje termékük szükséges az infekciós fonál fejlődéséhez és köztük funkcionális interakciót sikerült kimutatnunk.



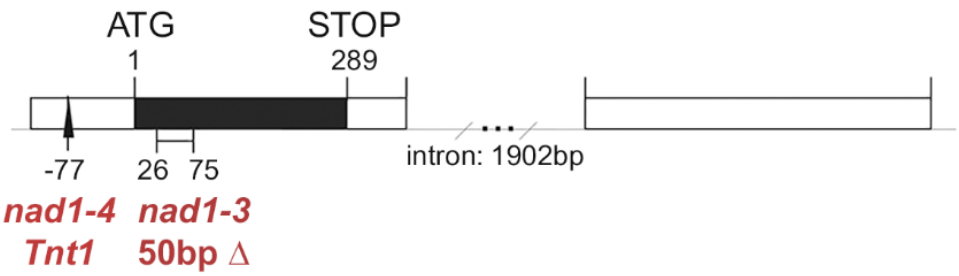
5.12. ábra: Az MtIEF és RPG fehérje kölcsönhatás vizsgálata élesztő-két-hibrid (Y2H) (A) és két-molekulás fluoreszcencia komplementáció (BiFC) (B) segítségével. (A) Az *IEF* és *RPG* gének az élesztő Gal4 aktivációs (GA), illetve a Gal4 kötő (GB) doménjéhez való fúzionáltatása után *S. cerevisiae* PJ69-4A élesztő törzsbe lettek transzformálva. Az interakciókat adenin és hisztidin jelenlétében (SD-LT), illetve hiányában (SD-AHLT) összehasonlító növekedési tesztben vizsgáltuk. (B) A YFP fluoreszcens fehérje N terminális részét az RPG, míg a C terminális részét az IEF fehérjéhez fúzionáltattuk és termeltettük egyszerre dohánylevél (*N.benthamiana)* epidermisz sejtekben. Az NSP1 és NSP2 kölcsönhatás pozitív kontroll szolgált a kísérletben. A fehérjék közötti interakció a transzformációt követő 4. napon került ellenőrzésre konfokális mikroszkóp segítségével. **Méretarány:** 10 μm.

5.3. A *NAD1* gén két új alléljának azonosítása és jellemzése

Ebben a fejezetben a korábban bemutatott *nad1-4* mutáns vonalhoz kapcsolódó eredményeket mutatom be (5.2. ábra/A). Az általunk azonosított mutáns vonal fenotípusa nagyon hasonló egy másik vonal fenotípusához, melyet 7Y-nak neveztek el (Domonkos et al., 2013). A 7Y vonalat a csoportunkkal együttműködő laboratóriumban (Növény-Mikroba Interakció csoport, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, MATE, Gödöllő) Domonkos Ágota azonosította és az eredmények fejezetben *nad1-3* néven kerül tárgyalásra (Domonkos et al., 2017). Időközben a klasszikus genetikai térképezésen alapuló módszer segítségével azonosították a fenotípust okozó szimbiotikus gént. Az általunk vizsgált mutáns szekvencia ellemzésével pedig igazoltuk, hogy az inszerció ugyanennek a génnek rontotta el a funkcióját.

Munkánkkal párhuzamosan, megjelent egy közlemény is, amelyben az általunk azonosított és vizsgált gén szerepét tanulmányozták a szimbiózis kialakulásában és a *NAD1* (Nodules with Activated Defense 1) nevet adták a génnek (Wang et al., 2016). Mi ennek a génnek két újabb mutáns alléljét azonosítottuk és az együttműködő partnerünkkel közösen jellemeztük egy társszerzős közleményemben (Domonkos et al., 2017).

A *NAD1* gén genomi struktúráját és az általunk vizsgált vonalakban a mutációk helyét az 5.13. ábra mutatja. A gén egy 289 bázispár hosszú kódoló szakaszt tartalmazó exonból, és-egy nem transzlálódó exonból áll. Az általunk azonosított mutánsban a gén 5’ nem transzlálódó régiójában található egy *Tnt1* inszerció. A közleményben (Domonkos et al., 2017) bemutatásra került, hogy az inszerció következtében a génről nem képződik mRNS, tehát ugynevezett null-mutánsnak tekinthető ez a vonal. A *nad1-3* mutánsban egy 50 bp hosszúságú deléció történt a gén kódoló régiójában.



5.13. ábra: A *NAD1* génszerkezete és a mutációk helye a *nad1-3* és *nad1-4* mutánsokban. A fekete téglalap a kódoló részt, az üres téglalapok a nem transzlálódó részt jelölik. Egy 50 bázispár hosszúságú deléció található a *nad1-3* mutáns első exonjában, míg a *nad1-4* mutánsban a *Tnt1* retrotranszpozon az 5’ nem transzlálódó régióba inszertálódott.

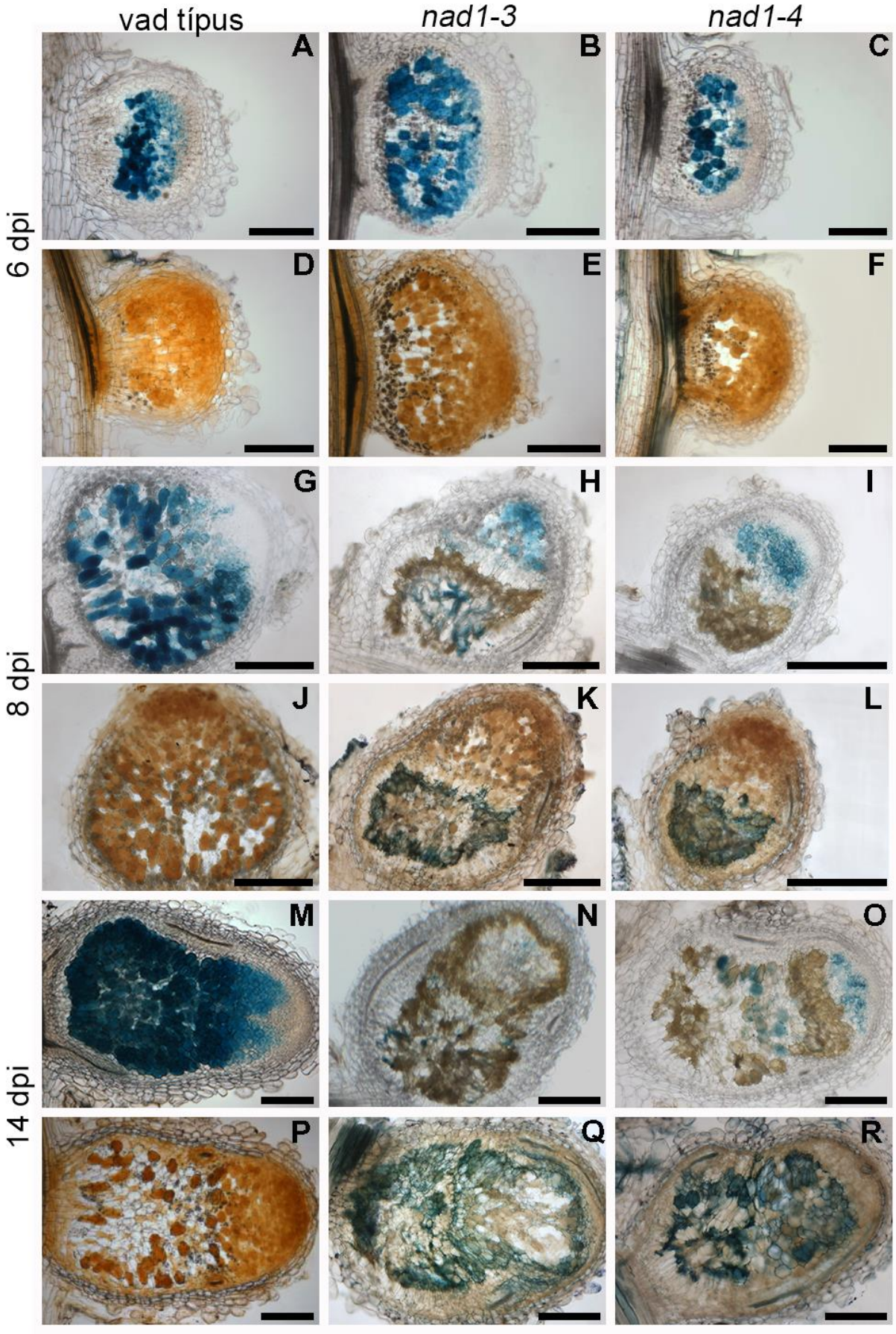
5.3.1. A *nad1-3* és *nad1-4* mutánsok jellemzése

A két mutáns vonal fenotípusának jellemzője, hogy a fertőzést követő 14. napon a mutáns gümőkben a nitrogénkötő zónában elhalt sejteket figyelhetünk meg, és nem alakul ki a vad típusra jellemző gümő szerkezet. A növény a nitrogénhiány egyértelmű jeleit mutatja, a mutáns növények Fix^- mutáns fenotípust mutatnak.

Annak megállapítására, hogy szimbiózis kialakulásának melyik az a fázisa, amikor egyértelműen elkülöníthető a vad típustól, a *nad1-3, nad1-4* és vad típusú növényekről a fertőzést követően különböző időpontokban mintát szedtünk és a gümőmetszeteken a baktériumok jelenlétét *GUS,* az esetleges növényi védekezési reakciókat pedig a polifenolok festésével vizsgáltuk (5.14. ábra). A fertőzést követő 6. napon a vad típusú gümőket a rhizóbium baktériumok sikerrel kolonizálták (5.14. ábra /A), illetve polifenol felhalmozódásának semmilyen jelét nem tudtuk megfigyelni (5.14. ábra /D). A szimbiózis kialakulásának ebben a fázisában a vad típusú növényekhez hasonlóak a *nad1-3* (5.14. ábra /B és E) és *nad1-4* (5.14. ábra /C és F) mutáns növények gümői. A mutáns növényekben tehát, a rhizóbium baktériumok inváziója és a gümőfejlődés programjának kezdeti folyamatai a vad típushoz hasonlóak.

A fertőzést követő 8. napon a vad típusú gümőkben a zónázottság jelei már jelentkeznek, a baktériumokkal telt növényi sejtek nagyobbodásnak indultak (5.14. ábra /G), de a polifenol felhalmozódás még ebben a fázisban sem volt megfigyelhető (5.14. ábra /J). A *nad1-3* (5.14. ábra /H és K) és *nad1-4* (5.14. ábra /I és L) mutáns gümőkben a gümő apikális részén az inváziós zónában kimutathatóak voltak ugyan a baktériumok, azonban a gümő középső részében, ahol a nitrogénkötő zónát alkotó sejtek lennének, már csak elhalt növényi sejteket láthattunk, amelyek egyértelmű polifenol festődést mutattak. A polifenol tartalmú vegyületek felhalmozódása a rhizóbium baktériummal szemben aktiválódó növényi védekezési reakciók jele.

A fertőzést követő 2. hétben a vad típusú növényen megnyúlt, baktériumokkal teli gümők láthatóak, melyekben polifenol tartalmú vegyületek továbbra sem találhatóak (5.14. ábra /M és P). Ez a fejlettségi fázis tekinthető az érett gümőnek. A *nad1-3* (5.14. ábra /N és Q) és *nad1-4* (5.12. ábra /O és R) mutáns gümőkben ekkor már az egész gümőre kiterjedő barnás elszíneződés volt megfigyelhető, és baktériumokat csak elvétve találtunk.


vad típus
nad1-3
nad1-4
6 dpi
8 dpi
14 dpi
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R

5.14. ábra. A barna elszíneződés a *nad1* mutánsokban a polifenolos vegyületek felhalmozódási eredménye. Gümőmetszetek vad típusú (első oszlop) és *nad1-3* (második oszlop) és *nad1-4* (harmadik oszlop) mutáns növényekről. A gümőmetszetek GUS festése a baktériumok jelenlétének a detektálására (A-C, G-I és M-O), míg a kálium-permanganát és metilénkék festések a polifenolok felhalmozódásának kimutatására alkamas (D-F, J-L és P-R). A mintákat a rhizóbium fertőzést követő 6. (A-F), 8. (G-L), illetve 14. napon (M-R) lettek begyűjtve. A vad típusú és mutáns gümők a fertőzést követő 6. napon nem mutatnak különbséget, a mutánsokban a vad típushoz hasonlóan megtörténik a gümők kolonizációja, illetve nem jelentkezik detektálható polifenolfelhalmozódás a gümőkben (A-F). A barna pigmentáció a mutánsokban a 8. napon jelentkezik (H és I), a pigmentáció átfed a polifenol felhalmozódással (K és L), ami a növényi védekezési reakciók beindulását jelzi. A polifenolok felhalmozódása a mutáns gümőkben a 14. napon az egész gümőre kiterjed (N, O, Q és R). Barna pigmentáció a vad típusú gümőkben nem detektálható egyik időpontban sem (A, D, G, J, M és P). **Méretarány:** 200 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a két mutáns vonal fenotípusa teljesen megegyezik. A fejlődésnek induló gümők inváziója sikeresen elkezdődik, a rhizóbium baktériumok növényi sejtbe történő lefűződése nem mutat eltérést a vad típushoz képest. A lefűződést követően azonban, amikor a bakteroid differenciáció történik, a növényi sejtek elhalnak, a szimbionta baktériumok ellen növényi védekezési válaszreakciók indulnak be.

Ezek alapján feltételezhetően a gén terméke a szimbiózis kialakulása során a növényi védekezési reakciók elnyomásához szükséges. Ezt támasztja alá, hogy a növényi védekezési reakcióban szerepet játszó gének kifejeződése egyértelműen felerősödött a mutáns növényekben a vad típusú gümőkhöz képest. A védekezési reakciók működésére engedett következtetni, hogy a mutáns gümősejtekben csak elhalt baktériumokat figyelhetünk meg az elektronmikroszkópos vizsgálatok során , és a konfokális-lézer mikroszkópos vizsgálatok alapján a bakteroid differenciáció a mutánsokban csak részben következik be.

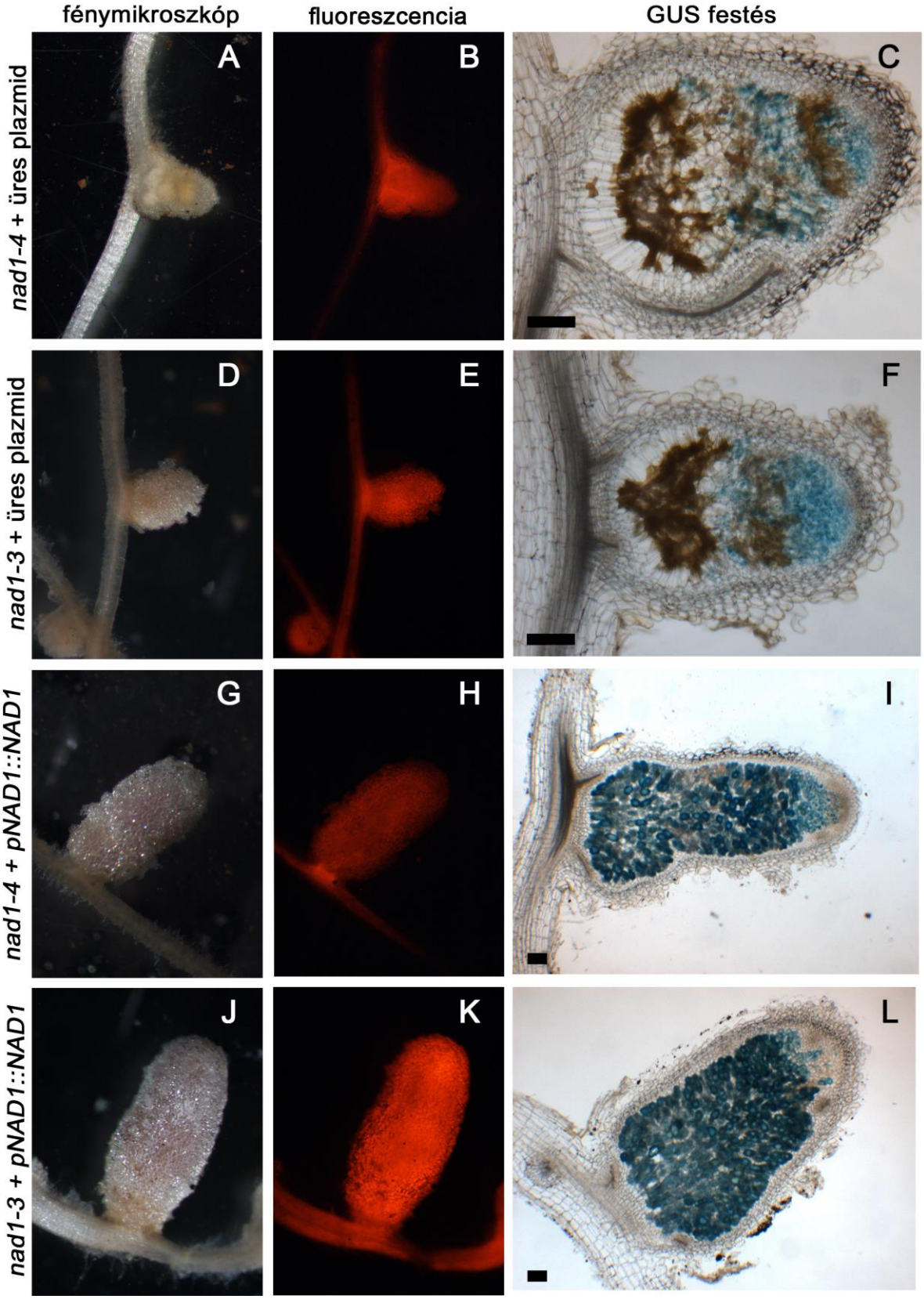
Független vizsgálatok alapján hasonló következtetést vontak le, és erre utal a gén elnevezése is (*Nodules with Activated Defense 1*).

5.3.2. A *nad1-3* és *nad1-4* mutánsok funkcionális komplementációja

Annak érdekében, hogy igazoljuk a *nad1-3* és *nad1-4* mutánsban a *NAD1* gén hiánya okozza a mutáns fenotípust, komplementációs kísérleteket végeztünk. Ehhez a teljes *NAD1* gént klónoztuk a 400 bázispár hosszúságú saját promóterével együtt és az így elkészített konstrukciót az üres vektoros kontrollal együtt Medicago gyökértranszformáció segítségével *nad1-3* és *nad1-4* mutáns növényekbe juttattuk be (5.15. ábra). A *nad1-3* és *nad1-4* mutáns növények üres vektorral transzformált gyökerein továbbra is a mutáns fenotípusra jellemző erős pigmentációt mutató gümőket találtunk (5.15. ábra /A-F). Ezzel ellentétben, a komplementáló *pNAD1::NAD1* konstrukcióval transzformált *nad1-3* és *nad1-4* mutáns növények gyökerein a vad típusra jellemző gümőket figyelhetünk meg (5.15. ábra /G-L). Elkészítettünk egy olyan konstrukciót is, amely nem tartalmazta a *NAD1* gén 3' nem kódoló szakaszát. Ezzel a konstrukcióval csak részleges komplementációt figyelhettünk meg a mutánas vonalakban.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a *nad1-3* és *nad1-4* mutáns vonalakban a *NAD1* géntermék hiánya okozza a fenotípust és a *NAD1* gén működőképességéhez a teljes génre szükség van.

.



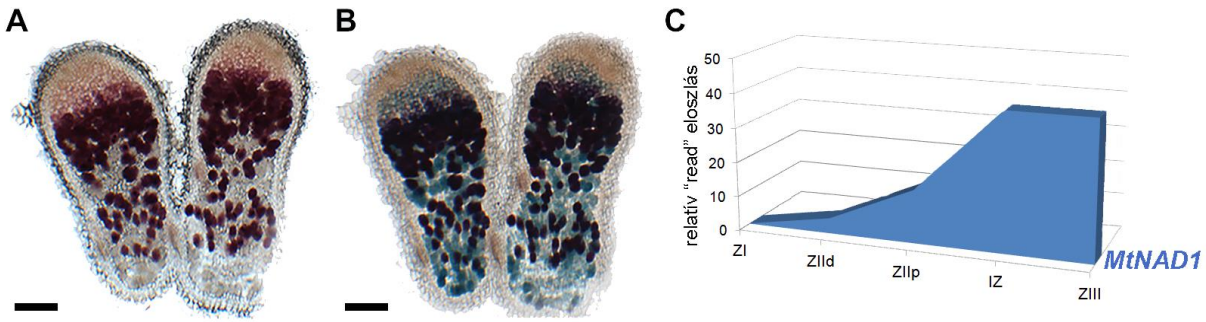
5.15. ábra: A *nad1* mutáns növények genetikai komplementációja a *NAD1* génnel. A *nad1-4* (A-C) és *nad1-3* (D-F) mutáns gümők fenotípusa az üres vektorral transzformált gyökerekeken. A *pNAD1::NAD1* (saját promóterrel meghajtott *NAD1* gén) konstrukciókkal transzformált *nad1-4* (G-I) és *nad1-3* (J-L) mutáns gyökereken helyreállt a gümők fenotípusa.
Méretarány: 125 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm.

5.3.3. A *NAD1* génexpressziójának vizsgálata

Az MtGEA adatbázisát elemezve kijelenthető, hogy a *NAD1* gén kizárólag a gümőben expresszálódik. Az elérhető RNS szekvenálási adatok elemzése (Breakspear et al., 2014;Roux et al., 2014) alapján a *NAD1* gén az érett gümő nitrogénkötő és átmeneti zónájában expresszál (az RNS szekvenálási adatok ábrázolása az 5.16. ábra C paneljén látható).

A *NAD1* génexpressziójának nyomonkövetésére a *GUS* riportergént a NAD1 gén saját promóterének ellenőrzése alá vontuk (lásd előző fejezet) és gyökértranszformációval vad típusú növényekbe juttattuk be. Rhizóbium fertőzést követően gümőket gyűjtöttünk be a transzgenikus gyökerekről, majd GUS és LacZ kettős festéssel egyszerre nyomon követtük a promóter aktivitását és a baktériumok jelenlétét. Érett gümőben, a fertőzést követő 14. napon egyértelműen látszik a nitrogénkötő zónában detektálható promóteraktivitás (5.16. ábra /A), illetve a baktériumok jelenléte a gümőben (5.16. ábra/B). A promóteraktivitás és a baktérium jelenléte egybeesik a metszeteken.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a *NAD1* gümőspecifikus expressziót mutat, illetve a baktériumok lefűződése után a baktériumokat tartalmazó növényi sejtekben mutat aktivitást.

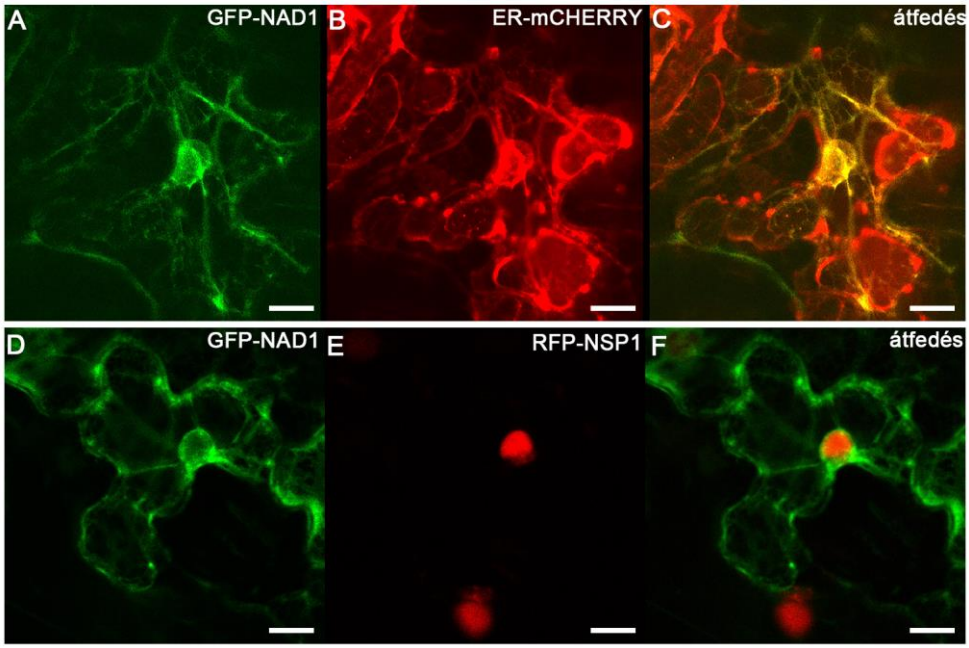


5.16. ábra: A *NAD1* gümőspecifikusan, a baktériumokat tartalmazó gümősejtekben fejeződik ki. A *NAD1* génexpressziójának vizsgálata *pNAD1::GUS* konstrukcióval transzformált vad típusú növényekről származó gümőkben a *lacZ* riportergént tartalmazó *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 14. napon (A és B). A transzgenikus gyökerekről származó gümők a *NAD1* promóteraktivitására (magenta) (A) és a baktérium jelenlétére (kék) (B) is festve lettek GUS-LacZ kettős festés segítségével. A *NAD1* génexpressziója RNS szekvenálási adatok felhasználásával (C) a gümő egyes részeinek lézer-disszekcióval való elkülönítése után (Roux et al. 2014). **Méretarány:** 200 μm, **Metszetvastagság:** 70 μm. **ZI**: merisztéma; **ZIId**: inváziós zóna felső része; **ZIIp**: inváziós zóna alsó része; **IZ**: átmeneti zóna; **ZIII**: nitrogénkötő zóna.

5.3.3. A NAD1 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

A NAD1 fehérje sejten belüli nyomonkövetésére létrehoztunk egy a GFP-vel N-terminálisan fúzionált NAD1 fehérjét (GFP-NAD1) tartalmazó konstrukciót, ahol a GFP-NAD1 fúziós fehérje a p35S promóter szabályozása alatt áll. A GFP-NAD1 konstrukciót *N. benthamiana* levelekbe transzformáltuk (5.17. ábra). A GFP-NAD1 konstrukció mellett használtunk egy endoplazmatikus (ER-mCHERRY), valamint egy sejtmagi (RFP-NSP1) fluoreszcens markert is (5.17. ábra). A GFP-NAD1 és RFP-NSP1 fluoreszcens jelek eltérő mintázatot mutattak, tehát a NAD1 fehérje nem a magban lokalizálódik. Az ER-mCHERRY endoplazmatikus markerrel ugyanakkor egyértelmű átfedést kaptunk.

Az eredmények alapján elmondható, hogy *N. benthamiana* levélben a GFP-NAD1 fehérje az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódik. Medicago gümőből származó mintákon is szerettük volna megerősíteni ezt az eredményt, de nem tudtunk fluoreszcens jelet detektálni a gümőmetszeteken. Ráadásul a GFP-el fúzionált NAD1 konstrukcióval nem tudtuk menekíteni sem a mutáns fenotípust ami arra utal, hogy a GFP-NAD1 fúziós forma nem tudja betölteni funkcióját.



5.17. ábra: A NAD1 fehérje lokalizációjának vizsgálata különböző sejten belüli markerek segítségével *N. benthamiana* dohánylevél epidermisz sejtekben. A p35S::GFP-NAD1 sejten belüli megjelenését egy ER (Endoplazmatikus retikulum) marker, illetve egy nukleáris fehérjével (pUBq10::RFP-NSP1) együtt vizsgáltuk. A fehérjék lokalizációját konfokális-lézer mikroszkópiával vizsgáltuk. A GFP-NAD1 jel (zöld szignál) endoplazmatikus retikulumra jellemző lokalizációt mutat (A és D), ami egyértelmű átfedést mutat az ER marker lokalizációjával (B és C), a GFP és DsRED szignál átfedése sárga színnel jelölve (C). A GFP-NAD1 jele nem mutat átfedést a magi lokalizációt mutató RFP-NSP1 fluoreszcens jelével (vörös színnel, E és F). **Méretarány:** 10 μm

5.4. Az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízise

Ebben a fejezetben egy már ismert, a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához nélkülözhetetlen gén, az *NSP2* két pontmutáns alléljának összehasonlító jellemzését mutatom be.

Az *NSP2* gén az NF szignál útvonal egyik esszenciális tagja (Oldroyd and Long, 2003;Kalo et al., 2005). A nullmutáns fenotípust eredményező delécios mutáns vonal mellett eddig két pontmutáns allélt írtak le. Az első allélt a D11 mutáns vonal (EMS mutagenezissel előállított vonal) segítségével azonosították és *nsp2-3* nevet kapta (Kalo et al., 2005). Az *nsp2-3* pontmutánban a mutáció egy glutaminsav – lizin cserét eredményez az NSP2 fehérje 232. pozíciójában (E232K). Az aminosavcserének köszönhetően gyenge mutáns allél jött létre, aminek eredményeként a mutáns növény még képes apró gümőkezdeményeket létrehozni a gyökerén (Kalo et al., 2005). A másik mutáns vonalat (NF-FN9199, gyors neutron besugárzással előállított vonal) egyértelműen Nod^- mutánsként jellemeztek. Alléltesztek, szekvenálási és térképezési adatok egyaránt valószínűsítették, hogy az *NSP2* gén egy új, pontmutáns allélja okozza a szimbiotikus fenotípust (Kontra-Kováts et al., 2019).

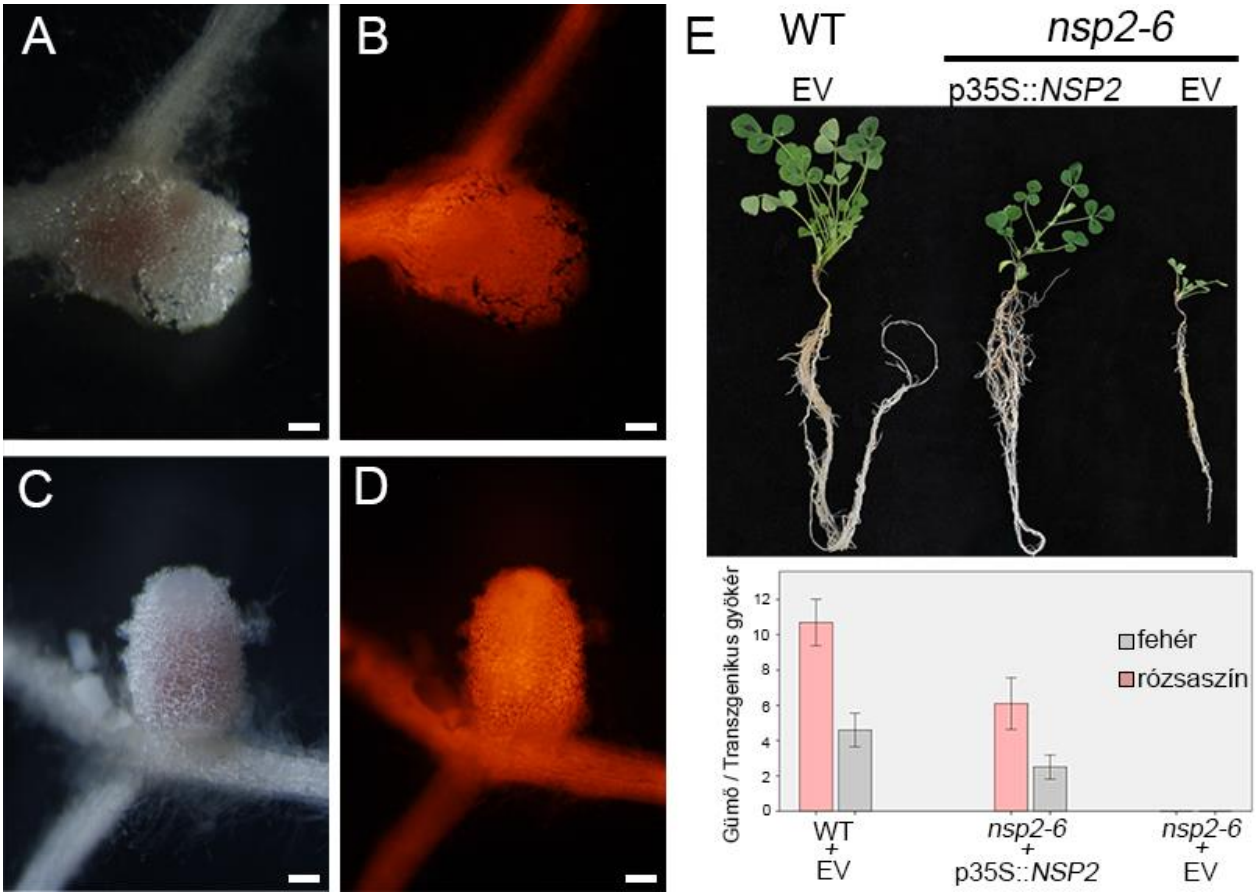
A két pontmutáns vonal fenotípusos és funkcionális analízise eddig nem történt meg. Munkánk során a két pontmutáns vonal összehasonlító jellemzését végeztük el és az eredmények egy elsőszerzős közleményemben kerültek publikálásra (Kovacs et al., 2021).

5.4.1. Az NF-FN9199 mutáns vonal genetikai komplementációja

A genetikai térképezés és az *NSP2* gén szekvenálása az NF-FN9199 mutánsban valószínűsítette, hogy ez a mutáns egy új *nsp2* allél. Ennek bizonyítására, genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. Az *NSP2* gén olyan natív promóter szakasza, amellyel a mutáns fenotípust menekíteni lehet, eddig nem ismert és ezidáig kizárólag a konstitutívan aktív 35S promóterrel meghajtott *NSP2* génnel sikerült komplementálni az *nsp2* nullmutánsokat (Kalo et al., 2005). Az *NSP2* gént a konstitutívan aktív p35S promóterrel fúzióban tartalmazó konstrukciót *A. rhizogenes* közvetített „hairy-root" transzformációs rendszerrel juttattuk be az NF-FN9199 mutáns növények gyökerébe. A transzgenikus gyökereket a konstrukción lévő *DsRED* markergén termékének fluoreszcenciája alapján azonosítottuk. A növények növekedési ütemét, illetve a gümőket a transzgenikus gyökereken a *lacZ* riportergént (pXLGD4) hordozó *S. medicae* WSM419 rhizóbium baktériummal való fertőzés után 3 héttel vizsgáltuk. A vad típusú *NSP2* génnel transzformált NF-FN9199 mutáns növények hajtás része az üres vektorral transzformált

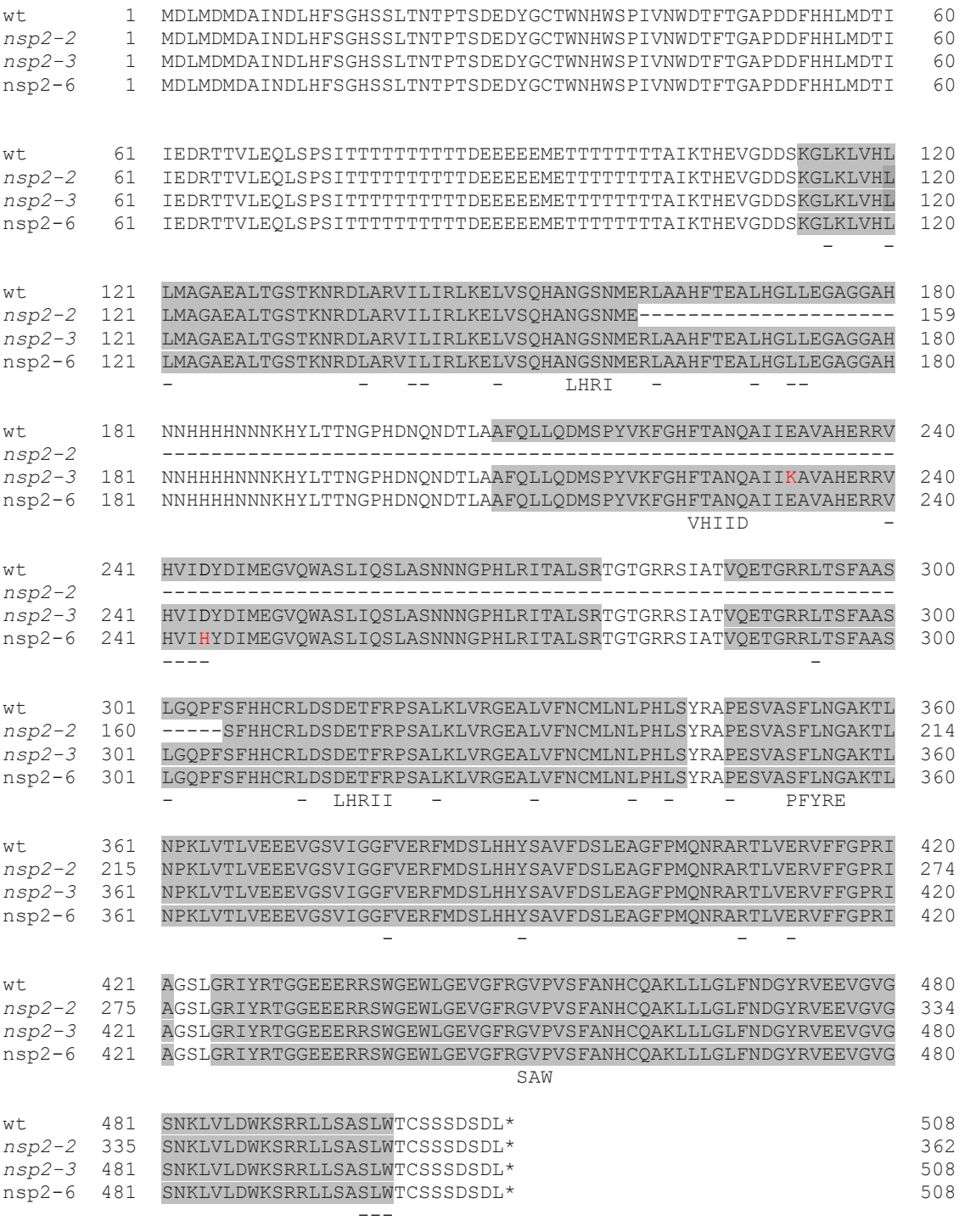
(„EV”) mutáns növényekhez képest jóval nagyobb zöld tömeget és sötétzöld leveleket növesztett nitrogénszegény tápoldattal való öntözés mellett rhizóbium fertőzést követően (5.18. ábra /E). Ezen kívül rózsaszín gümőket figyeltünk meg a *p35S::NSP2* konstrukcióval transzformált NF-FN9199 mutáns növények gyökerein, melyek megerősítették a mutáns fenotípus menekítését (5.18. ábra /A, B és E). Habár az NF-FN9199 mutáns növényeken formálódó gümők kisebbek voltak, mint az üres vektorral transzformált vad típusú növényeken láthatóak (5.18. ábra /C és D), a bennük lévő leghemoglobin miatt rózsaszínűek voltak, ami a működő szimbiotikus interakció eredménye. Emellett a *p35S::NSP2* konstrukcióval transzformált NF-FN9199 növényeken a vad típushoz képest kevesebb funkcionáló rózsaszín gümőt figyeltünk meg (5.18. ábra /E), ami arra enged következtetni, hogy a *p35S::NSP2* csak részben képes helyreállítani a nitrogénkötő szimbiózist az NF-FN9199 mutánsban.

Annak ellenére, hogy a komplementáció hatékonysága csak részleges, ez az eredmény igazolta, hogy az *NSP2* génben történt pontmutáció okozza az NF-FN9199 mutáns fenotípusát, ezért erre a mutánsra innentől kezdve *nsp2-6* allélként hivatkozok.



5.18. ábra: Az *NSP2* gén képes menekíteni az NF-FN9199 (*nsp2-6*) mutáns vonal szimbiotikus fenotípusát. A p35S promóterrel szabályozott *NSP2* gént (*p35S::NSP2*) az *Agrobacterium rhizogenes* közvetített gyökér „hairy-root" transzformációs rendszerrel juttattuk be az NF-FN9199 (*nsp2-6*) mutáns vonalba. A transzformáns növényeket *S. medicae* WSM419 baktériummal fertőztük. Az egész gümőkről készült fénymikroszkópos (A és C) és DsRED fluoreszcens (B és D) képek a baktériummal való fertőzést követő 21. napon készültek. A komplementált rózsaszín gümők a *p35S::NSP2* konstrukcióval transzformált NF-FN9199 (*nsp2-6*) mutáns vonal transzgenikus gyökerén (A és B). Rózsaszín működő gümők az üres vektorral (EV) transzformált vad típusú (WT) *M. truncatula* A17 gyökereken (C és D). A csökkent hajtásnövekedés részleges menekítése az NF-FN9199 (*nsp2-6*) mutáns vonalban a *p35S::NSP2* konstrukcióval való transzformációt követően (E). A rózsaszín és fehér gümők átlagos száma a transzgenikus gyökereken (WT n = 14, *nsp2-6* n = 18 és 22 a *p35S::NSP2* és üres vektorral transzformált gyökereken). A szórás értékek a standard hibát ábrázolják. **Méretarány**, 200 µm (A–D)

Az *nsp2-6* mutáns fenotípusát eredményező pontmutáció az *NSP2* kódoló szekvencia 730. nukleotid pozíciójában történt. A guanin citozin báziscsere egy aszparagin (D) hisztidin (H) cserét eredményezett a fehérje 244. aminosavpozíciójában (D244H). Ez az aminosavcsere a VHIID motívum egyik konzervatív pozícióját érinti, melyről a motívum a nevét is kapta. A korábban azonosított *nsp2-3* pontmutánsban a mutáció (E232K) szintén a VHIID motívumban történt, azonban egy nem konzervált pozícióban. Az elsőként leírt és null allélnak tekintett *nsp2-2* mutáns egy 435 bázispáros deléciót hordoz a kódoló régióban. A három mutáns allél aminosav szintű összehasonlítását az 5.19. ábra mutatja be.



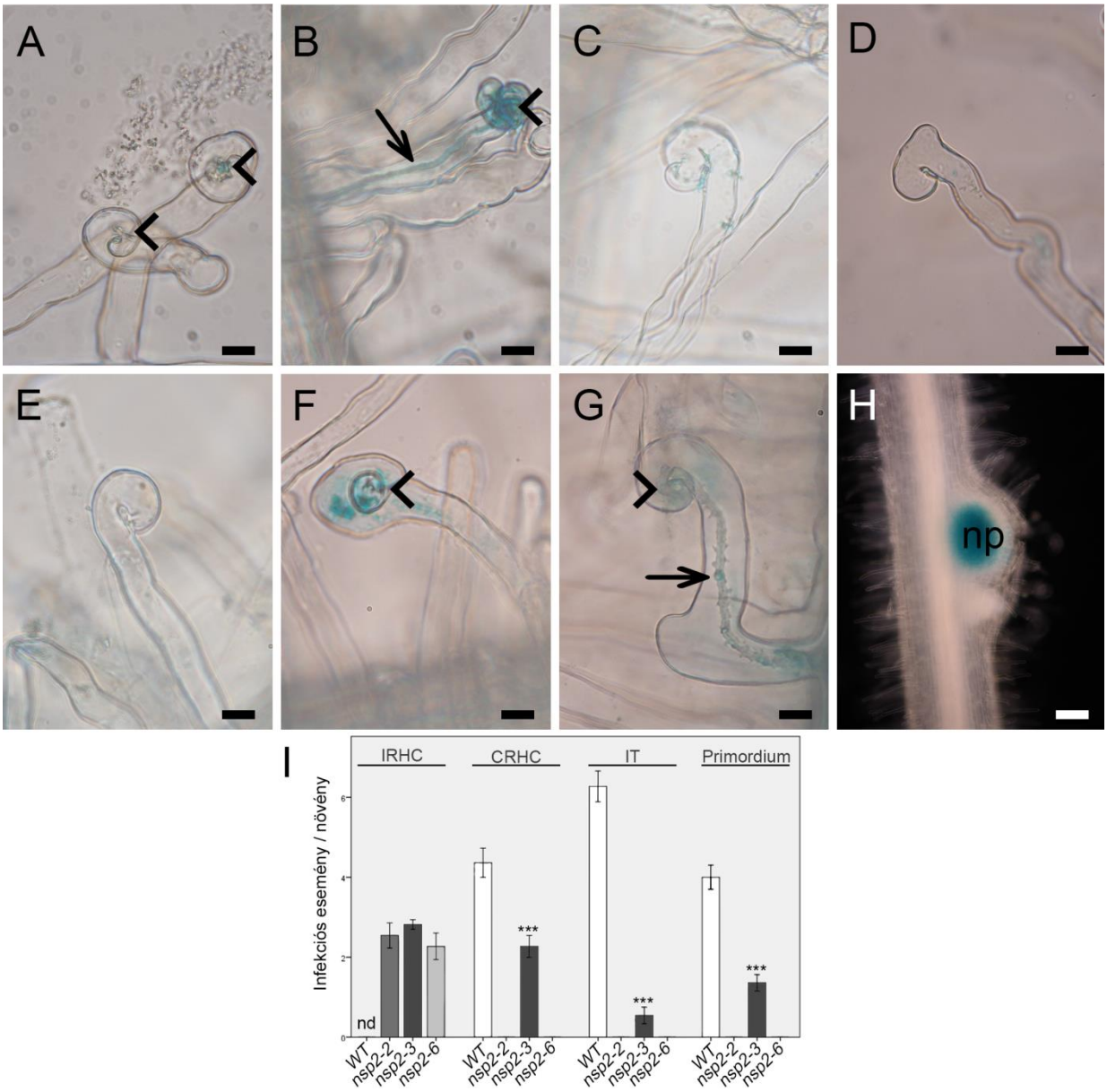
5.19. ábra: A vad típusú és mutáns NSP2 fehérjék aminosav szekvencia összehasonlítása. Az egyes aminosavmutációk az *nsp2-3* (D11; E232K) és *nsp2-6* (NF-FN9199; D244H) mutáns allélok esetén pirossal lettek kiemelve. A GRAS domén konzervált LHRI, VHIID, LHRII, PFYRE és SAW motívumai szürkével lettek kiemelve. A motívumok konzervált aminosav pozícióit aláhúzással jelöltem. Az *nsp2-2* allélben lévő deléció az LHRI, VHIID és LHRII motívumokat érinti.

5.4.2. Az *nsp2-3* és *nsp2-6* pontmutánsok összehasonlító fenotipikus jellemzése

A különböző *nsp2* mutáns és vad típusú növények szimbiotikus gümőfenotípusának összehasonlításához a növényeket a *GUS* riportergént hordozó *S. medicae* WSM419 rhizóbium baktériummal fertőztük, a fertőzés után különböző időpontokban mintákat szedtünk és GUS-festést követően a fenotípusokat mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

A rhizóbium fertőzést követően a vad típusú növények gyökerén az alábbimorfológiai változások figyelhetőek meg; körülbelül két nappal a fertőzést követően következik be a gyökérszőrök görbülése (5.20. ábra /A és I), majd a fertőzést követő 3. napon elindul a meggörbült gyökérszőrben a baktériumok által teljesen kitöltött infekciós fonál fejlődése (5.20. ábra /B és I). Az *nsp2-2* mutáns növényen kizárólag gyökérszőr-deformációkat figyelhetünk meg (5.20. ábra /C és I). Az *nsp2-2* mutánshoz hasonlóan az *nsp2-6* mutáns gyökereken szintén csak gyökérszőr-deformációkat találunk a fertőzést követő harmadik napon (5.20. ábra /D és I) és afertőzést követő 14. napon is csak gyökérszőrdeformációkat láthatunk (5. 20. ábra /E).

Az *nsp2-3* mutáns gyökereken, bár a vad típushoz képest szignifikánsan kevesebb számban, de találunk gyökérszőr-görbületeket (5.20. ábra /F) és a görbült gyökérszőrökben az infekciós fonalak is kialakulnak (5.20. ábra /G). Ezek az infekciós fonalak azonban kanyargósak, vastagok és abnormális morfológiát mutatnak. Az *nsp2-3* mutáns gyökereken néhány infekciós fonál eléri az osztódó kéreg sejteket és kialakulnak a gümőkezdemények (primordiumok, 5.20. ábra /H és I).



5.20. ábra: Az *nsp2* allélok korai infekciós fenotípusa a *gusA* riportergént hordozó *S. medicae* WSM419 baktériummal történő fertőzést követően. A fertőzést követő 2. napon a gyökérszőrgörbülés (A) és a 3. napon az infekciós fonál fejlődése (B) figyelhető meg a vad típusú növények gyökerein. Az *nsp2-2* és *nsp2-6* mutáns növények gyökerein a baktériumok által kiváltott legerősebb válasz a gyökérszőrök nem teljes görbülése (incomplete root hair curling röviden IRHC) 3 nappal a fertőzés után és az *nsp2-6* mutáns gyökerein még 14 nap után is (E). A teljes gyökérszőrgörbülés (Complete root hair curling, röviden CRHC) (F) és az abnormális fenotípusú infekciós fonál (Infection thread röviden IT) fejlődése (G) a fertőzést követő harmadik, és a gümőprimordium (primordia) formálódása a fertőzést követő negyedik napon az *nsp2-3* mutáns gyökereken. Nyílhegy: gyökérszőrgörbülés; nyíl: infekciós fonál; np: gümőprimordium. Az infekciós események átlagos számát a vad típusú (WT (n = 13)) és *nsp2* mutáns (*nsp2-2* n = 11, *nsp2-3* n = 15, és *nsp2-6* n = 11) gyökereken a fertőzést követő 3., míg gümőprimordiumok (primordia) számát a vad típusú (WT (n = 16)) és az *nsp2-3* (n = 16) a fertőzést követő 4. napon számoltuk, nd: nem jellemző, ezért nem meghatározott (I).
A szórás értékek a standard hibát ábrázolják. A csillagok a Student-féle t-teszt alapján meghatározott szignifikancia szintet jelentik: ***P ≤ 0,001. **Méretarány**: 50 µm (A–G) és 25 µm (H).

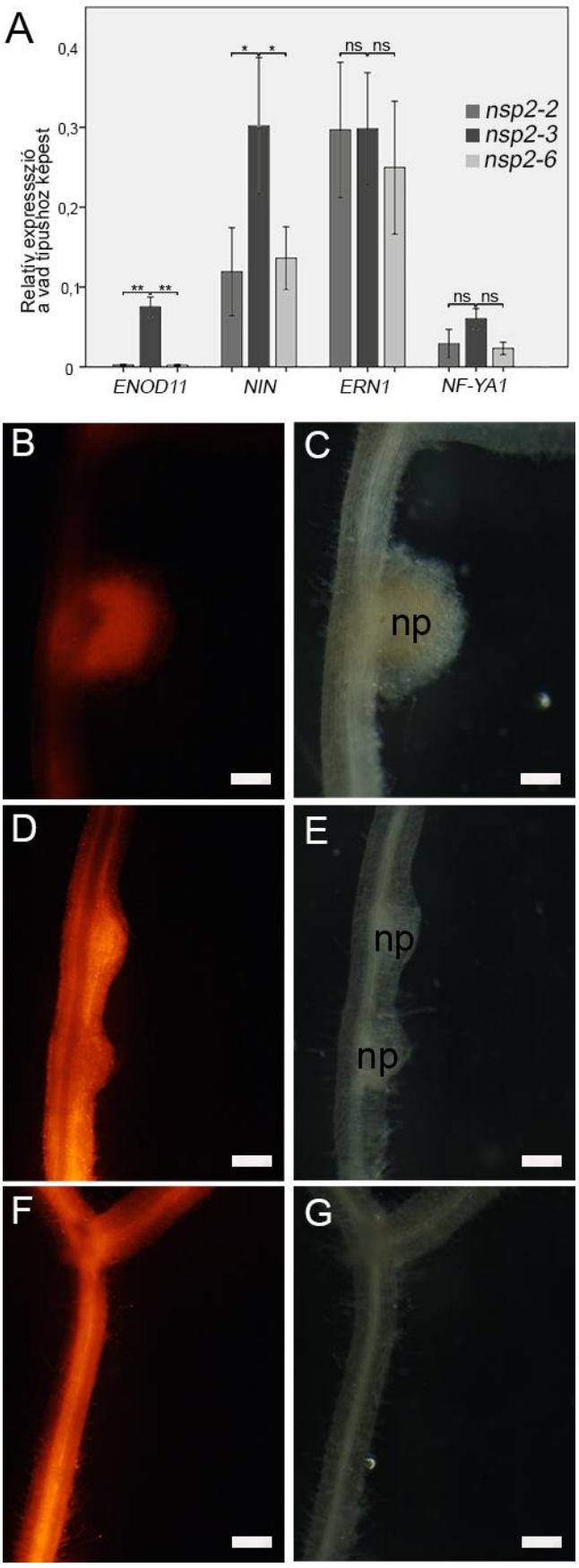
5.4.3. Az NSP2 E232K és D244H aminosavcserék hatása az NF szignalizációs útvonalra és a gümőfejlődésre

A közös szimbiotikus útvonal a DMI3 fehérje után kettéválik a nitrogénkötő szimbiózis és a mikorrhiza szimbiózis irányába. Az NSP2 fehérje elsődlegesen a nitrogénkötő szimbiózishoz, azon belül a NF jelátvitelhez és a nitrogénkötő szimbiózis-specifikus génexpresszió aktiválásához, valamint a gümőorganogenezishez és az infekcióhoz is szükséges (Oldroyd and Long, 2003). Annak megállapítására, hogy az *NSP2* különböző pontmutációi hogyan befolyásolják a nitrogénkötő szimbiózis specifikus szignál-útvonalakat, a DMI3/IPD3 és az NSP1/NSP2 regulációs komplexek által regulált (*ENOD11, NIN, ERN1* és az *NF-YA1*) gének expresszióját vizsgáltuk négy nappal a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követően RT-qPCR technikával (Oldroyd and Long, 2003;Kalo et al., 2005;Horvath et al., 2011). A génexpressziós vizsgálatokat a csoportunk együttműködő laboratóriumában (Növény-mikroba Interkació csoport, Genetikai és Biotechnológiai Intézet, MATE, Gödöllő) dolgozó Domonkos Ágota végezte.

Az *nsp2* mutánsokban az *ENOD11, NIN* és *NF-YA1* gének relatív transzkript mennyiségének jelentős csökkenését figyeltük meg, de ezeknek a géneknek a relatív expressziója minden esetben magasabb volt az *nsp2-3* mutánsban, mint az *nsp2-2* és *nsp2-6* mutánsokban, ami arra enged következtetni, hogy a szimbiotikus szignál az *nsp2-3* mutánsban részlegesen ugyan, de működik (5.21. ábra /A). Bár az *ERN1* relatív expressziója is alacsonyabb volt a mutánsokban, nem mutatott semmilyen eltérést a különböző *nsp2* allélok között, ami arra enged következtetni, hogy az NSP2 közvetetten befolyásolhatja az *ERN1* kifejeződésének a szintjét (5.21. ábra /A).

A hatékonyan működő gümő kialakulása két jól koordinált fejlődésbiológiai folyamat eredménye. Az epidermiszen keresztüli bakteriális (i) invázió és a kortexben indukálódó (ii) gümőfejlődési program (gümőorganogenezis), és bármelyik folyamat hibája leállítja a másikat is. Az *nsp2-6* mutánsban, hasonlóan az nsp2-3-hoz leáll az epidermális válasz és nem történik meg a baktériumok inváziója, tehát a NSP2 fehérje D244H mutációja megállítja ezt a folyamatot, azonban ez alapján még nem tudjuk, hogy befolyásolja-e a közvetlenül gümőorganogenezis folyamatát.

A kalcium és kalmodulin függő DMI3 kináz és a citokinin receptor CRE1 egyaránt esszenciális a gümőorganogenezis folyamatához (Gleason et al., 2006b;Plet et al., 2011). Ezeknek a fehérjéknek az autoaktív formái spontán gümőképződéshez vezetnek rhizóbium hiányában (Gleason et al., 2006b;Gonzalez-Rizzo, 2006;Tirichine et al., 2007). Annak bizonyítására, hogy az NSP2 fehérje 244. pozíciójában lévő aszparagin aminosav változása befolyásolja-e a gümőorganogenezis folyamatát a CRE1 citokinin receptor autoaktív formáját (CRE1 L267F vagy CRE1*) (Ovchinnikova et al., 2011) vad típusú (5.21. ábra /B és C), *nsp2-3* (5.21. ábra /D és E) és *nsp2-6* (5.21. ábra /F és G) mutáns növények gyökerébe juttattuk *A. rhizogenes*-közvetített „hairy root" transzformációval. A transzgenikus növényeket rhizóbium mentes körülmények között neveltük és nyolc héttel a transzformálás után vizsgáltuk a spontán gümők megjelenését. A transzgenikus gyökereket a konstrukción lévő független *DsRED* markergén által kódolt fluoreszcens fehérje segítségével azonosítottuk. Primordium-szerű spontán gümőket azonosítottunk az *nsp2-3* transzgenikus gyökereken (5.21. ábra /D és E), melyek minden esetben kisebbek voltak a vad típusú transzgenikus gyökereken azonosított spontán gümőknél (5.21. ábra /B és C), ami arra enged következtetni, hogy bár az NSP2 E232K mutáció a gümőorganogenezis beindításához nem szükséges, de a vad típushoz képest késés figyelhető meg a



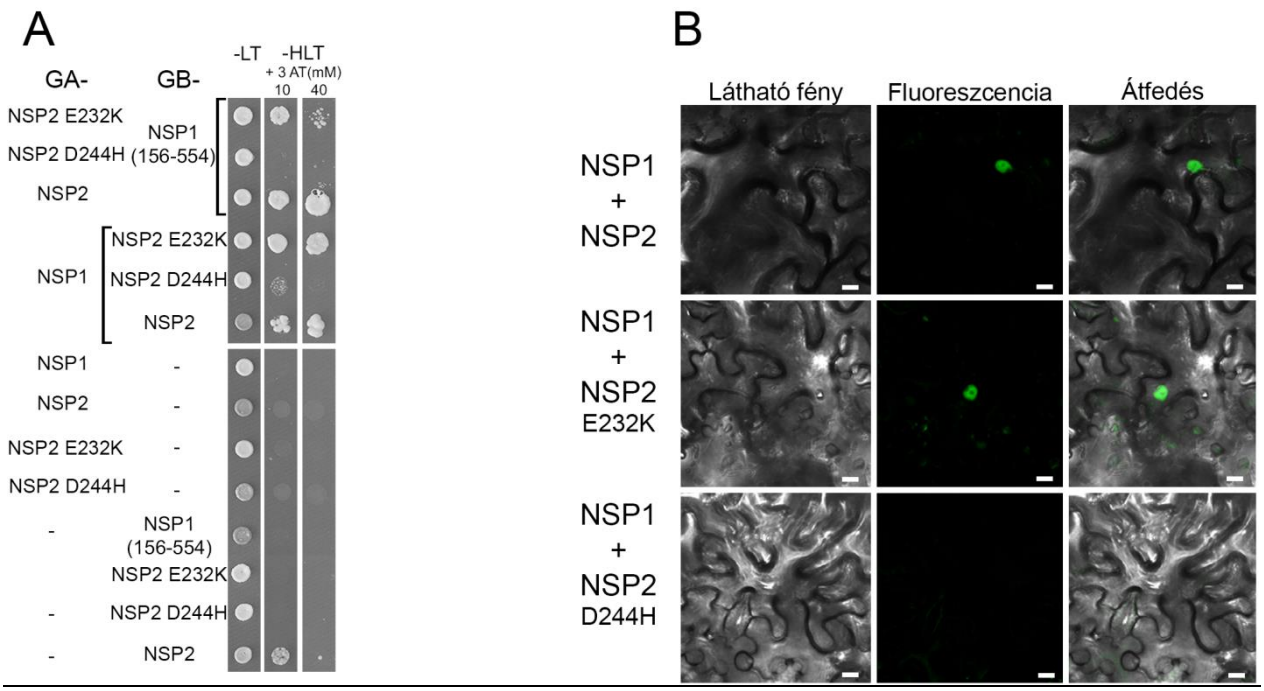
gümők növekedésében. Ezzel ellentétben, az *nsp2-6* mutáns transzgenikus gyökerein nem azonosítottunk gümőszerű struktúrákat (5.21. ábra / F és G), ami azt jelenti, hogy az NSP2 244. pozíciójában lévő aszparaginsav esszenciális a gümőfejlődés beindításához.

5.21. ábra: Az *ENOD11*, *NIN*, *ERN1* és *NF-YA1* gének relatív transzkript szintje az *nsp2-2*, *nsp2-3* és *nsp2-6* mutáns növényekben a vad típushoz képest négy nappal a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követően (A). A spontán gümőfejlődési teszt az autoaktív CRE1* konstrukcióval (B-G). A transzgenikus gyökereket a DsRED fluoreszcens fehérje segítségével azonosítottuk (B, D és F). A spontán gümők a vad típusú (B és C) és a spontán gümőprimordium formálódása az *nsp2-3* (D és E) transzgenikus gyökereken. A reprezentatív gyökérszegmens a spontán gümőket nem tartalmazó *nsp2-6* transzgenikus gyökereken (F és G). A relatív transzkript értékeket öt biológiai ismétlés alapján határoztuk meg. A szórás értékek a standard hibát ábrázolják, a csillagok a szignifikancia szinten jelentik a Student féle t-teszt alapján: ns $P \geq 0,05$, *$P \leq 0,05$, and **$P \leq 0,01$. **Méretarány**, 200 μm (B–G).

5.4.4. Az NSP2 D244H mutációja (*nsp2-6*) a VHIID motívumban esszenciális az NSP1-NSP2 jelátviteli modul kialkulásához

Korábban végzett élesztő két-hibrid (Yeast two-Hybrid Y2H) és két molekulás fluoreszcencia komplementációs (Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)) kísérletek alapján kiderült, hogy az NSP1 és NSP2 fehérjék képesek kölcsönhatásba lépni egymással, és a fehérje komplex képes különböző (*ENOD11, ERN1* és *NIN*) szimbiotikus gének promóteréhez kötődni (Hirsch et al., 2009). Azt is megállapították, hogy az NSP2 E232K mutációja az *nsp2-3* mutánsban bár csökkenti a fehérje autoaktivációját, nem befolyásolja az NSP1 fehérjével való interakciót az élesztő két-hibrid kísérleti rendszerben (Hirsch et al., 2009).

Az *nsp2-6* nullmutáns fenotípusa és az a tény, hogy a pontmutáció a VHIID motívum egyik kitüntetett és konzervált pozíciójában van, felvetette a kérdést, hogy vajon az NSP2 D244H mutáció hogyan befolyásolja az NSP1 és NSP2 fehérjék kölcsönhatását. Ennek eldöntésére vizsgáltuk, hogy az $NSP2_{D244H}$ mutáns fehérje képes-e interakcióba lépni az NSP1 fehérjével élesztő két-hibrid (Y2H) rendszerben. A kísérletben a vad típusú és a két pontmutáns (E232K és D244H) NSP2 formákat használtuk. Az NSP2 transzkripciós faktor Y2H rendszerben erős autoaktivációt mutat a Gal4 DNS kötő motívumához fúzionálva (Hirsch et al., 2009). Annak érdekében, hogy a vad típusú NSP2 fehérje kölcsönhatását is tesztelni tudjuk amikor a Gal4 DNS kötő motívumhoz fúzionáltattuk, a tápközegben a 3-aminotriazol (3-AT) szintjét több lépcsőben növeltük addig, amíg az NSP2 autoaktivitása megszűnt, de még az interakciót képesek voltunk detektálni (5.22. ábra /A). Azok az élesztő törzsek, melyek kombinációban az NSP1 és NSP2, illetve az $NSP2_{E232K}$ fehérjéket a Gal4 DNS kötő- és aktivációs doméneket fuzionálva egyaránt tartalmazták képesek voltak a szelekciós táptalajon is nőni (5.22. ábra /A), ami arra enged következtetni, hogy az NSP1 egyaránt képes kölcsöhatni a vad típusú és az E232K pontmutáns NSP2 fehérjével. Azonban amikor az $NSP2_{D244H}$ pontmutánst teszteltük ebben a rendszerben az NSP1 fehérjével bármilyen kombinációban, az élesztő törzsek nem voltak képesek nőni erős szelekció mellett (5.22. ábra/A), ami arra enged következtetni, hogy az NSP2 fehérje 244. pozícióban lévő aszparagin aminosav, ami a VHIID motívum egyik konzervált és névadó pozíciójában van, esszenciális az NSP1 fehérjével történő komplex formálódáshoz.



5.22. ábra: Az NSP1 és NSP2 vad ás mutáns formák kölcsönhatásának tesztelése élesztő két-hibrid (Y2H) (A) és a két-molekulás fluoreszcens komplementációs (BiFC) tesztekkel (B). (A) Az NSP1 és NSP2 vad és mutáns verziókat az élesztő Gal4 aktivációs (GA) és a Gal4 DNS kötő (GB) doménjéhez fúzionáltuk és *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A élesztő törzsbe transzformáltuk. Az NSP1 és NSP2 formák közötti interakció tesztelése a különböző konstrukciókat tartalmazó élesztők hisztidin jelenlétében (-LT) és hiányában [-HLT kiegészítve 3-amino-1,2,4-triazollal (3-AT)] történő növesztése mellett. (B) A YFP fluoreszcens fehérje N-terminális részét az NSP1 fehérjéhez, míg a C-terminális részét a vad típusú és mutáns az NSP2 fehérjékhez fúzionáltuk és az NSP1 az NSP2 különböző formáival *N. benthamiana* levélbe ko-infiltráltuk, majd az infiltrálást követő harmadik napon konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a leveleket. **Méretarány**: 10 μm.

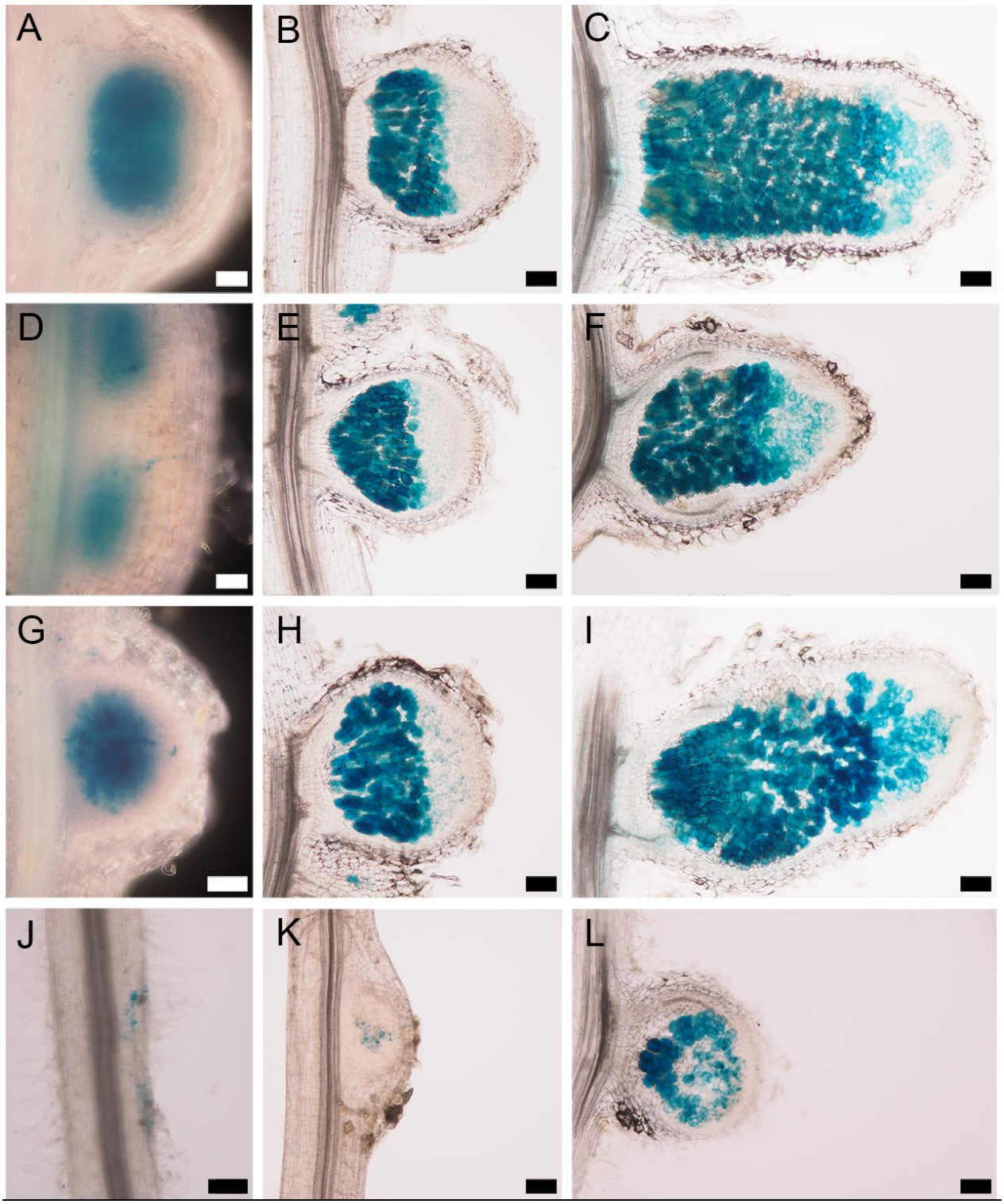
Az $NSP2_{E232K}$ és $NSP2_{D244H}$ pontmutánsok és NSP1 fehérjék közötti interakció erősségét β-galaktozidáz enzimaktivitás mérésekkel határoztuk meg. Ennek eredménye alapján elmondható, hogy az NSP2 fehérje E232K pontmutációja is jelentősen csökkentette az NSP1 fehérjével a kölcsönhatás erősségét (Melléklet 6. ábra /A) a vad típusú NSP2 fehérjéhez képest. Azonban azok az élesztő törzsek, melyek az $NSP2_{E232K}$ pontmutáns és NSP1 fehérjét is tartalmazzák képesek voltak nőni szelekciós táptalajon, ami arra enged következtetni, hogy a mutáció nem teszi teljesen tönkre az interakciót. Az $NSP2_{E232K}$ pontmutációhoz képest mindkettő kombinációban szignifikánsan kisebb mértékű enzimaktivitást mértünk az $NSP2_{D244H}$ pontmutáns esetében (Melléklet 6. ábra /A). Mivel az NSP1 fehérjét az $NSP2_{D244H}$ pontmutánssal kombinációban tartalmazó élesztő nem volt képes nőni a szelekciós táptalajon, kijelenthetjük, hogy a mutáció a detektálhatóság mértékénél jobban gátolja a kölcsönhatást. Mivel az $NSP2_{D244H}$ mutáns forma esetén nem sikerült kimutatni interakciót, felvetődött a kérdés hogy vajon maga a fehérje termelődik e és a negatív interakciót nem azért kaptuk, mert a pontmutáns forma nem termelődik. Ennek a kérdésnek a megválaszolására anti-HA westernblot analízist végeztünk az

élesztőben termeltett fehérjéken. Westernblottal sikerült mind a három NSP2 formát kimutatnunk, tehát az $NSP2_{D244H}$ és $NSP2_{E232K}$ pontmutációk nem befolyásolták az NSP2 fehérje termelődését (Melléklet 6. ábra /B).
Az élesztő két-hibrid kísérletek igazolására BiFC kísérleteket végeztünk *Nicotiana benthamiana* levelekben. A sárga fluoreszcens fehérje N-terminális (N-YFP) felét az NSP1 N-terminális részéhez, míg a sárga fluoreszcens fehérje C-terminális (C-YFP) felét az NSP2, $NSP2_{E232K}$ és $NSP2_{D244H}$ fehérjék N-terminális részéhez fúzionáltuk. Ezután a különböző NSP2 variánsokat az NSP1 fehérjével kombinációban *N. benthamiana* levélbe juttattuk *A. tumefaciens*-közvetített transzformálási módszerrel. Korábban az NSP1 és NSP2 fehérjék esetén magi lokalizációt figyeltek meg (Kalo et al., 2005;Smit et al., 2005). A mi rendszerünkben szintén a YFP fehérje magi lokalizációját figyeltük meg, amikor az NSP1 fehérjét az NSP2, vagy az $NSP2_{E232K}$ fehérjével párban fejeztettük ki *N. benthamiana* epidermisz sejtekben (5.22. ábra /B), ami ezeknek a fehérjéknek az interakcióját igazolja. Nem detektáltunk azonban magi lokalizációt amikor az NSP1 fehérjét az $NSP2_{D244H}$ pontmutáns formával ko-infiltráltuk (5.22. ábra /B). Ezek az eredmények bizonyítják az NSP2 fehérje 244. pozíciójában lévő konzervált aszparagin aminosav jelentőségét az NSP1 fehérjével való interakció esetében, illetve a két fehérje interakciójának jelentőségét a bakteriális invázió és a gümőorganogenezis irányításában.

5.4.5. Az *nsp2-3* mutáns törzsspecifikus fenotípusa

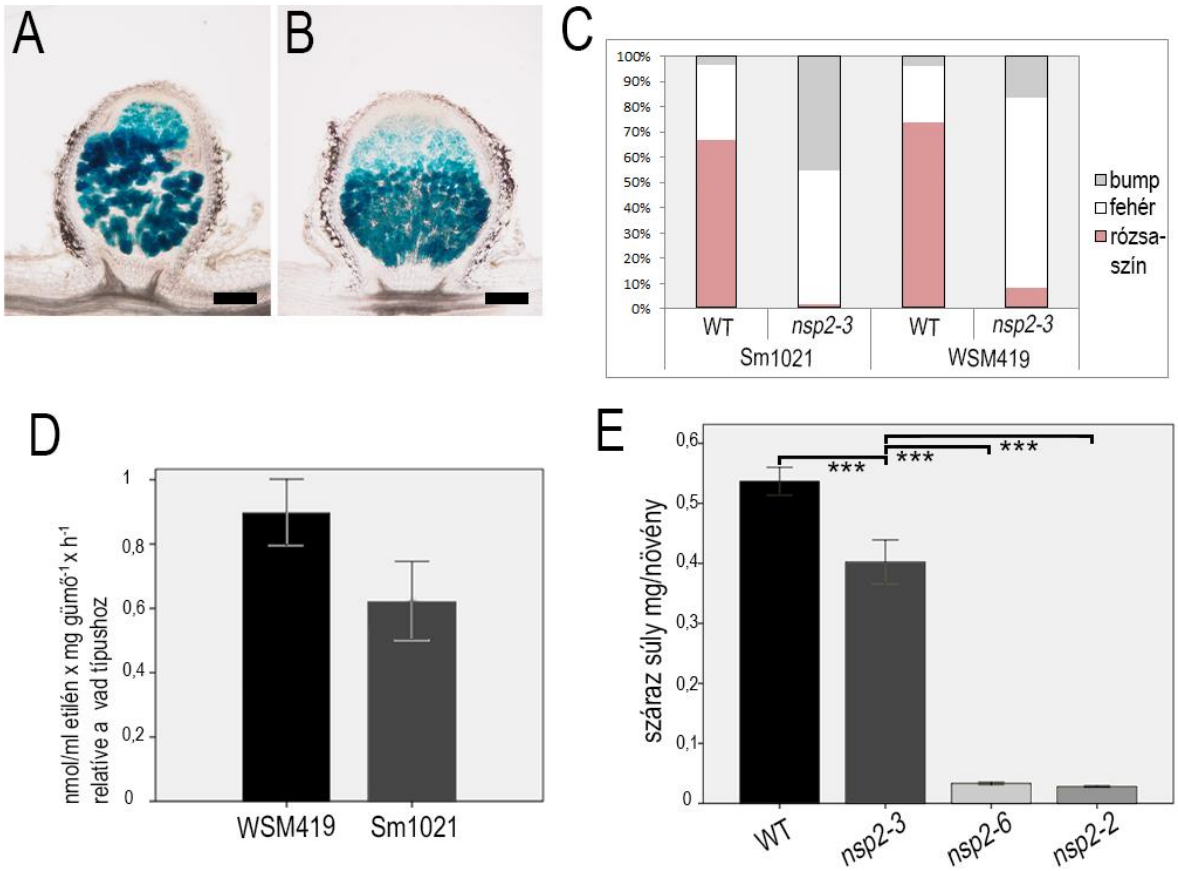
Az *nsp2-3* mutánsban megfigyelt gümőkezdemény kialakulása a *S. medicae* WSM419 baktérium törzzsel történő fertőzést követő 4. napon (5.20. ábra /H és I) nem teljesen egyezett meg a korábban leírt adatokkal. Korábbi eredmények alapján az *nsp2-3* mutáns gyökerein a *S. meliloti* 1021 törzzsel való fertőzést követően 4 nappal nem találtak gümőprimordiumokat, és a későbbi időpontokban is csak kis fehér gümőket figyeltek meg az *nsp2-3* mutáns növények gyökerein (Kalo et al., 2005).

Az *nsp2-3* mutáns rhizóbium törzsfüggő fenotípusának megállapításához vizsgáltuk a gümőfejlődés kinetikáját a *lacZ* markergént túltermelő *S. meliloti* 1021 (pXLGD4) és *S. medicae* WSM419 (pXLGD4) szimbiotikus baktérium törzsekkel történő fertőzést követően vad típusú kontroll *M. truncatula* A17 mellett. A gümőprimordium kialakulását figyelhetjük meg a vad típusú növények gyökerein négy nappal a fertőzést követően mindkét szimbiotikus partnerrel történő fertőzést követően (5.23. ábra /A és D), illetve az *nsp2-3* mutáns növény gyökerein a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzés után (5.23. ábra /G). Ezzel szemben a *S. meliloti* 1021 baktériummal történő fertőzés után, az *nsp2-3* mutáns gyökereken kizárólag a gyökérszőrökre tapadt baktériumokat figyelhetünk meg (5.23. ábra /J). Kerek fehér, illetve minden esetben a szimbiotikus baktériumokat tartalmazó gümőket figyelhetünk meg a kétféle szimbiotikus partnerrel fertőzőtt vad típusú növények gyökerein (5.23. ábra /B és E), illetve a *S. medicae* WSM419 baktériummal fertőzött *nsp2-3* mutáns gyökereken (5.23. ábra /H) tíz nappal a fertőzést követően. Ugyanebben az időpontban a *S. meliloti* 1021 törzzsel fertőzött *nsp2-3* mutánson kizárólag gümőprimordiumokat figyelhetünk meg (5.23. ábra /K). Hosszúkás és rózsaszín gümőket találtunk a vad típusú növények gyökerein a kétféle baktériummal történő fertőzést követő 18. napon (5. 23. ábra /C és I). Ezzel szemben fehér, olykor rózsaszínes és kissé elnyújtott gümőket figyelhetünk meg az *nsp2-3* mutáns növények gyökerein a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 18. napon (5.23. ábra /F) és kicsi fehér gümőket a *S. meliloti* 1021 baktériummal való fertőzés után ugyanebben az időpontban, ami arra enged következtetni, hogy a gümőfejlődési programban késés figyelhető meg az *nsp2-3* mutáns esetén ezzel a baktériummal történő fertőzés után (5.23. ábra /L).



5.23. ábra: Az *nsp2-3* mutáns szimbiotikus fenotípusának rhizóbium törzsfüggése. Az A17 vad típusú növény gümőfenotípusa a *lacZ* riportergént túltermelő *S. medicae* WSM419 (A-C) és a *S. meliloti* 1021 (G-I) törzsekkel történő fertőzést követő 4. (A, G), 10. (B, H) és 18. (C, I) napon ugyanolyan képet mutat. Az *nsp2-3* mutáns növény a *S. medicae* WSM419 törzzsel való fertőzést követő 4. (D) és 10. (E) napon a vad típushoz hasonló fenotípust mutat, de a gümőfejlődésben kis mértékű késés figyelhető meg a fertőzést követő 18. napon (F). Az *nsp2-3* mutáns növény a *S. meliloti* 1021 törzzsel való fertőzés után 4 (J), 10 (K) és 18 (L) egyaránt jelentős késést mutat. **Méretarány**: 100 μm.

Elenyésző számban, de a *S. meliloti* 1021 (5.24. ábra /A), illetve a *S. medicae* WSM419 (5.24. ábra /B) baktériummal való fertőzést követően egyaránt megfigyeltünk rózsaszín gümőket az *nsp2-3* mutáns gyökerein a fertőzést követő 18. napon, ami arra enged következtetni, hogy a működő nitrogénkötés ezzel a baktériummal történő fertőzést követően is kialakul, csak nem tökéletes a szimbiotikus kölcsönhatás. Megszámoltuk és kategorizáltuk a vad típusú és az *nsp2-3* mutáns növények gyökerein fejlődő gümőket a két féle baktériummal való fertőzést követő 18. napon (5.24. ábra /C). A vad típusú növényen valamivel több rózsaszín (működő) gümőt figyeltünk meg a *S. medicae* WSM419 baktériummal történő fertőzést követően (5.24. ábra /C). Ez az eredmény összefüggésben van azzal a megfigyeléssel, hogy a *M. truncatula* A17 genotípusának a *S. medicae* WSM419 törzs jobb hatásfokú szimbiotikus partnere, mint a *S. meliloti* 1021 (Terpolilli et al., 2008).

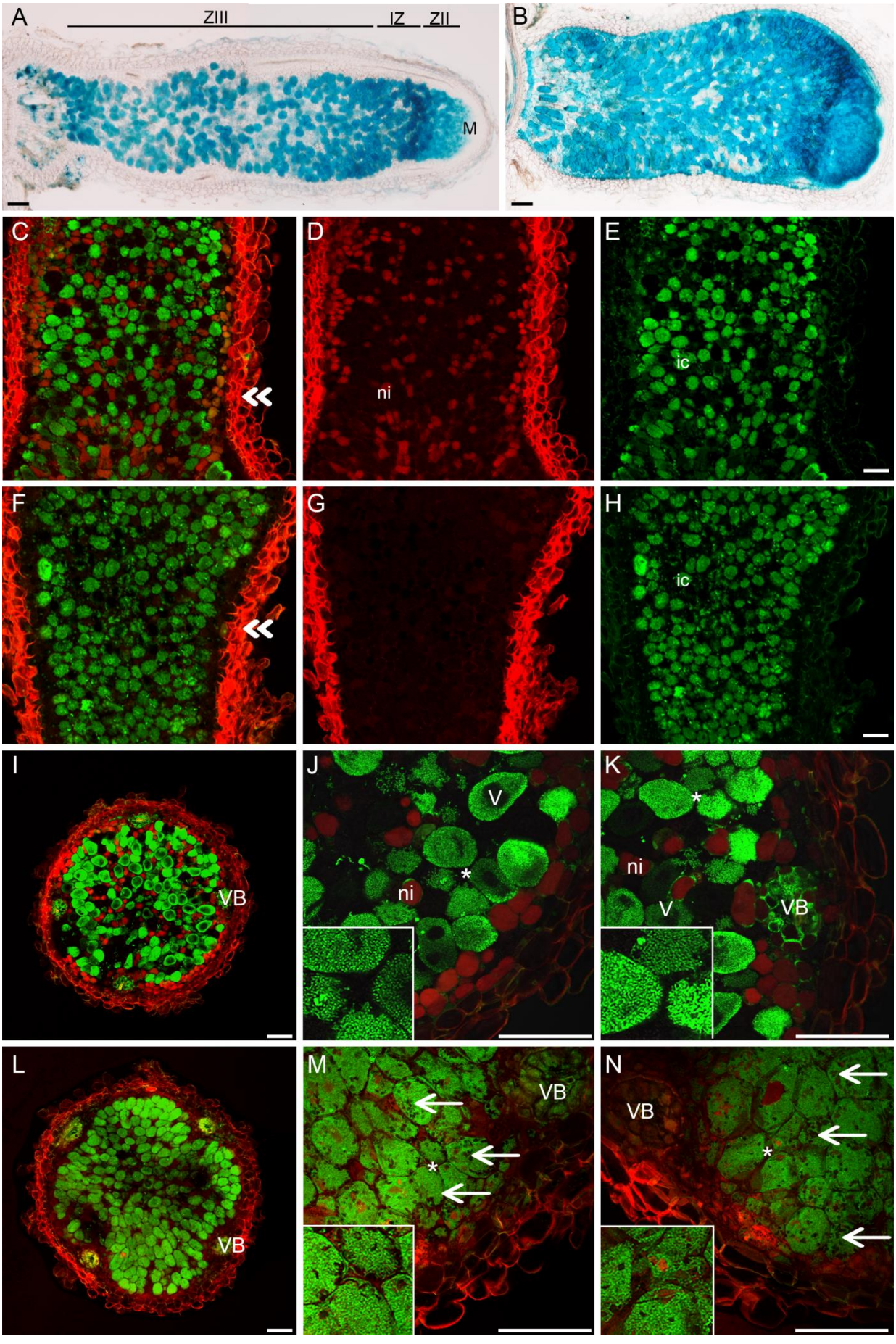


5.24. ábra: Az *nsp2-3* mutáns növényen kialakuló rózsaszín gümők nitrogénkötő képessége jobb a *S. medicae* WSM419 törzzsel való fertőzést követően. A működő gümők kolonizációja hasonló az *nsp2-3* mutáns növényen a *S. medicae* WSM419 (A) és *S. meliloti* 1021 (B) törzzsel való fertőzést követő 18. napon. A rózsaszín, fehér gümők és gümőkezdemények (bump) aránya a vad típusú és *nsp2-3* mutáns növényeken a fertőzést követő 18. napon (C). Az *nsp2-3* mutánsról származó rózsaszín gümők etilén produkciójának mérése a vad típushoz képest a *S. medicae* WSM419 és *S. meliloti* 1021 törzsekkel történő fertőzést követően (D).
A vad típusú és *nsp2* mutáns növények föld feletti részének szárazsúlya *S. medicae* WSM419 baktériummal történő fertőzést követő 8. héten (E). Az értékek 20 növény méréséből származnak és a szórás értékek a standard hibát jelentik (E). A csillagok a Student féle t-teszt alapján mért szignifikancia különbségeket jelölik (***P ≤ 0,001). **Méretarány**: 200 μm.

A nagyobb arányú gümőprimórdium és kisebb arányú fehér gümő az *nsp2-3* mutáns növényeken a szimbiotikus interakció kialakulásában bekövetkező jelentős késést jelenti a *S. meliloti* 1021 törzzsel a *S. medicae* WSM419 törzshöz képest (5.24. ábra /C). Bár a rózsaszín gümők aránya eltért a két törzzsel történő fertőzést követően, a gümők morfológiája és a kolonizáció mértéke hasonlónak bizonyult (5.24. ábra /A és B). A szimbiotikus interakció hatásfokának megállapítására a két féle baktériummal való fertőzést követő 21. napon, az *nsp2-3* és vad típusú növényekről gyűjtött rózsaszín gümő minták nitrogénkötési hatékonyságát határoztuk meg acetilén-redukció hatékonyságának mérésével. Ezzel a módszerrel képesek vagyunk a bakteriális nitrogenáz enzim aktivitását mennyiségileg meghatározni. Ezeket a méréseket Laczi Krisztián végezte (SZTE – Biológus Tanszékcsoport, Biotechnológiai Tanszék) együttműködés keretében. Az acetilén redukciós ráta a vad típusú növények esetében magasabb értékeket mutatott *S. medicae* WSM419 baktériummal fertőzött gümő minták esetében, mint a *S. meliloti* 1021 baktériummal fertőzött gümő minták esetén (5.24. ábra /D), ami arra enged következtetni, hogy a *S. medicae* WSM419 baktériummal történő szimbiotikus interakció nagyobb hatásfokkal működik. A különböző *nsp2* allélok és vad típusú növényeket szimbiotikus körülmények között növesztve és a növények zöld részének száraz súly méréseit elvégezve 8 héttel a fertőzést követően egyértelműen kijelenthető, hogy az *nsp2-3* mutáns növények biomasszája lényegesen nagyobb, mint a nullmutánsként jellemzett *nsp2-2* és *nsp2-6* alléloké (5.24. ábra/ E). Ezen eredmény alapján kijelenthető, hogy az $NSP2_{E232K}$ mutáció az aktuális szimbionta partner baktérium törzstől függően és eltérő mértékben befolyásolja a szimbiotikus interakciót.

5.4.6. Az NSP2 fehérje E232K mutációja befolyásolja a gümő inváziójá

Az *nsp2-3* mutáns növényeken a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 18. napon formálódó gümők, bár jóval kisebb számban vannak jelen és kevésbé megnyúlt morfológiával rendelkeznek, de a vad típushoz hasonló kolonizációt és nitrogénkötő hatékonyságot mutatnak. A gümő morfológiáját és a kolonizáció mértékét a *GUS* riportergént túltermelő *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 4. héten vizsgálva megállapítottuk, hogy az *nsp2-3* mutáns gümők vastagabbak és a kolonizáció mértéke jóval nagyobb volt a vad típusú gümőkhöz képest (5.25. ábra /A és B). Az *nsp2-3* mutáns növényeken formálódó rózsaszín gümők struktúrájának és kolonizáció mértékének további vizsgálatára a nukleinsavak festésére alkalmas SYTO13 festéket és konfokális mikroszkópiai módszert alkalmaztunk. Ezeket a képeket Ferhan Ayaydin (Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine (HCEMM)) készítette egy együttműködés keretében. A gümőmetszetek határának kiemelése érdekében a sejtfalak piros tartományban detektálható autofluoreszcenciáját használtuk. A 28 napos gümők SYTO13 festett hossz- (5.25. ábra /C-H) és keresztmetszeti (5.25. ábra /I és L) képein a vad és *nsp2-3* mutáns gümők eltérő kolonizációs mértéket mutattak és számos egyéb különbséget is detektáltunk. A GUS festéshez hasonlóan, a zöld fluoreszcenciát mutató infektált sejtek nagyobb számát detektáltuk az *nsp2-3* mutáns (5.25. ábra /F és L) gümőkben a vad típusú gümőkhöz képest (5.25. ábra/C és I). Emellett autofluoreszcenciát mutató nem fertőzött sejteket alig figyeltünk meg az *nsp2-3* mutáns gümők metszetein (5.25. ábra /G, H és L). A vad típusú gümő nitrogénkötő zónájából származó keresztmetszeti képek nagy nagyításán a fertőzött sejtekben jól láthatóak a megnyúlt bakteroidok, valamint a vakuólumokat tartalmazó gümősejtek (5.25. ábra /J és K). Az *nsp2-3* mutáns gümők nitrogénkötő zónájából származó keresztmetszeti képein a fertőzött gümősejtek nagyobb számát, nagyfokú kolonizációját és ezzel együtt a vakuólumok hiányát, illetve számos, a vad típusra nem jellemző granulumokat, minden bizonnyal felhalmozódó keményítőszemcséket figyeltünk meg (5.25. ábra /M és N). Az *nsp2-3* mutáns gümők a vad típusnál jóval nagyobb számú fertőzött sejtet és ezzel együtt jóval kevesebb számú nem fertőzött sejtet tartalmaznak, ami arra enged következtetni, hogy az NSP2 a fertőzött és nem fertőzött sejtek közötti arány kialakításában játszik fontos szerepet.


A
ZIII
IZ
ZII
M
B
C
D
ni
E
ic
F
G
H
ic
I
VB
J
V
*
ni
K
*
ni
V
VB
L
VB
M
VB
*
N
VB
*

5.25. ábra: Az *nsp2-3* gümők nagy mértékű és kiterjedt kolonizációt mutatnak. A vad tipusú (A) és *nsp2-3* (B) mutáns növényekről származó gümők GUS festése a *gusA* gént túltermelő *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 28. napon. A hasonló korú vad típusú gümők hossz - (C-E) és kereszt (L-N) metszeti, illetve az *nsp2-3* mutáns gümők hossz - (F-H) és keresztmetszeteinek (L-N) SYTO13 festése és elemzése konfokális mikroszkópos vizsgálatot követően. A gümőmetszetek határainak ábrázolása a sejtfal piros autofluoreszcenciájának segítségével (D és G). A C és F panel az átfedése a D és E, illetve a G és H paneleknek. A J és K panel az I nagy nagyítású-, illetve az M és N az L nagy nagyítású képei. ZIII, nitrogénkötő zóna; IZ, interzóna; ZII, inváziós zóna; M, merisztéma. Dupla nyílhegy a keresztmetszet pozícióját jelöli, ni, nem fertőzött (infektált) sejt; ic, fertőzött (infektált) sejt; VB, szállítóedénynyaláb (vascular bundle); V, vakuólum; nyíl, keményítő szemcse az *nsp2-3* gümősejtekben. **Méretarány**: 100 μm.

6. Eredmények megvitatása

6.1. A szimbiotikus nitrogénkötés kialakítására képtelen új mutánsok azonosítása

Az utóbbi három évtized kutatásainak köszönhetően egyre csak nő azoknak a géneknek a száma, amelyek fontos, meghatározó szerepet játszanak a nitrogénkötő szimbózis kialakításában a *M. truncatula* és *L. japonicus* modellnövényekben (Kang et al., 2016). Ezek a kutatások továbbra is azonosítanak új és még újabb szimbiotikus mutáns vonalakat, melyekben eddig ismeretlen gének szenvedtek mutációt (Starker et al., 2006;Pislariu et al., 2012;Domonkos et al., 2013). Valószínűsíthetjük, hogy még számos olyan gén vár felfedezésre, amelyek esszenciálisak a pillangósvirágú növények és szimbionta partnereik közötti szimbiotikus kapcsolat kialakításához. Doktori disszertációmban a *Tnt1* inszerciós mutagenezissel létrehozott európai mutáns parkban azonosításra került néhány új mutáns vonal vizsgálatát mutatom be. Ezen vonalak egyrésze eddig még nem ismert szimbiotikus génekben hordoztak mutációt, másrészük pedig már leírt szimbiotikus gének új mutáns alléljai. A klasszikus genetikai megközelítés – pl. térképezésen alapuló génazonosítás – meglehetősen időigényes folyamatának felgyorsítására kidolgoztunk egy hatékonyabb rendszert, melyben a mutáns vonalak fenotipikus analízise mellett új-generációs szekvenálási módszert használtuk a mutációt szenvedett *M. truncatula* gének azonosítására.
Ennek a kísérleti rendszernek a segítségével két mutáns vonalban sikeresen azonosítottuk a mutációt szenvedett szimbiotikus géneket.

6.2. Az új *IEF* gén azonosítása és funkcionális analízise

A disszertációmban részletesen tárgyalt egyik új mutáns vonalat infekciós mutánsként jellemeztük, és a mutáns vonalban azonosított szimbiotikus génnek pedig az *IEF* (**I**nfection-related **e**pidermal **f**aktor) nevet adtuk és az eredményeket egy elsőszerzős közleményemben publikáltuk (Kovacs et al., 2022).
Az *ief* mutáns növényen ugyan fejlődnek apró gümőkezdemények, ezeket azonban a szimbionta partner baktérium képtelen elárasztani. A mutáns vonal részletes jellemzése során megállapítottuk, hogy a legkorábbi válaszreakció, a baktérium csapdázását jelentő gyökérszőrgörbülés a vad típussal megegyező módon alakul ki, itt sem statisztikai, sem pedig morfológiai eltérést nem tudtunk kimutatni a mutáns és vad típusú növények között. A mutáns vonalban azonban a vad típushoz képest elenyésző számban és abnormálisan fejlődnek az

infekciós fonalak. A baktériumok így az epidermisz sejtrétegnél messzebbre nem jutnak el. A mutáns növények gyökerén, feltételezhetően az infekciós fonál fejlődésének hibája miatt a gümőorganogenezis programja átlagosan mintegy 48 órával később indul csak be. A gümőben detektált polifenol felhalmozódás nagy valószínűséggel az elakadt invázió és nem a mutáció következménye. A mutáns fenotípus az infekciós fonál fejlődésekor jelenik meg erőteljesen, míg a védekezési reakciók első detektálható jele ennél jóval későbbre tehető. Megállapítottuk, hogy az *ief-1* fenotípus alapján a mutációt szenvedett gén funkciója kizárlóag a bőrszöveti sejtekben szükséges az infekciós fonál kialakulásához és fejlődéséhez. Az *ief-1* mutáns esetén a szimbiotikus fenotípuson kívül egyéb fenotípust nem detektáltunk.

Hol helyezkedik el időben az *ief-1* mutáció a többi már ismert szimbiotikus génhez képest? Az *ief-1* mutáns fenotípusa egyértelműen a *nin (Schauser et al., 1999;Marsh et al., 2007)* és *ern1* (Middleton et al., 2007) mutánsoknál később jelenik meg. A *nin* mutánsban már a gyökérszőrgörbülés folyamatában megakad az infekció, nem történik meg a normális gökérszőr görbülés és gümőprimordiumban csak az inicializálódást lehet megfigyelni, rögtön utána elakad a folyamat. Az *ern1* mutánsban a gyökérszőrgörbülés a vad típushoz és az *ief-1* mutánshoz hasonlóan lezajlódik, azonban a mutánson egyáltalán nem képződnek infekciós fonalak, és a fejlődésben megrekedt gümőkezdemények inváziója sem történik meg. Az *rpg* (Arrighi et al., 2008) és *cbs1* (Sinharoy et al., 2016) mutáns fenotípusa nagyon nagy hasonlóságot mutat az *ief-1* fenotípusával. Mindkettő mutánsban megtörténik a gyökérszőrgörbülés és a gümőprimordium kialakulása. Az infekciós fonalak fejlődése is megkezdődik, de azok mindhárom mutáns esetében abnormálisan folytatódnak, nagyon nehéz különbséget tenni a három mutáns között. Az *rpg* és *cbs1* mutáns növényeken később, elenyésző számban ugyan, de találtak baktériumok által elárasztott gümőket, ebben eltérnek az *ief-1* mutánstól. A *rip1* (Miyahara et al., 2010) mutáns növényben is abnormális az infekciós fonál fejlődése, azonban ennek a mutánsnak gyökérszőr, levélszőr (trihóma), virág és termésfejlődési fenotípusa is van, ami alapján feltételezhető, hogy a mutációt szenvedett génnek egy általánosabb, nem csak a nitrogénkötő szimbiózisra specifikus funkciója van. A *lin* (Kiss et al., 2009) fenotípusára jellemző, hogy az infekciós fonalak normálisan kifejlődnek, azonban a gyökérszőr alján elakadnak, nem történik meg a formálódó gümő inváziója. Az *ipd3* (Horvath et al., 2011) mutáns növényen kétféle gümőfenotípust lehet megfigyelni: az egyik esetben a gümőket a baktériumok képtelenek elárasztani, az infekciós fonál elakad az epidermisz sejt alján, míg a másik esetben a gümőket az infekciós fonalak behálózzák ugyan, de a baktériumok nem tudnak lefűződni az infekciós fonalakból. Az *ipd3* funkciójára ez alapján később is szükség van, azonban elképzelhető hogy az *ipd3* késői fenotípusának oka a funkcionális redundancia miatt van (Jin et al., 2018). Az előbb tárgyalt

mutánsok fenotípusa alapján az *ief-1* egyértelműen a *nin* és *ern1* mutánsok után helyezkedik el és a *cbs1* és *rpg* mutánsokkal azonos szinten.

Az utódok genotípusának meghatározásával sikerült azonosítanunk a fenotípussal ko-szegregációt mutató inszerciót, komplementációs kísérletekkel pedig sikerült megerősítenünk az általunk azonosított gén szimbiózisban betöltött funkcióját, azonban csak részlegesen sikerült helyreállítanunk a mutáns fenotípust. Ennek magyarázatára több hipotézisünk is van. Az egyik lehetséges ok maga a gyökértranszformálási kísérleti rendszer. A gyökértranszformáció során ugyanis megváltozik a növény hormonháztartása (éppen ezen alapul a rendszer, hiszen az Agrobacterium a hormonháztartás megváltoztatásával új gyökerek fejlődését indukálja), aminek következtében számos gén expressziós szintje, térbeli és időbeli mintázata is megváltozhat. Az *ief-1* mutánshoz hasonlóan ugyanis több szimbiotikus gén is van, melyek mutánsait nehezen illetve csak részlegesen sikerült komplementálni ebben a kísérleti rendszerben (pl.: *ERN*, *NIN*, *NSP2* és *DMI3*). Ezek közül az *ern1* és *nin* fenotípusa hasonlít leginkább az *ief-1* mutáns fenotípusához. Az *ern1* és *nin* mutánsokban sem történik meg a fejlődésnek indult gümőprimordium bakteriális inváziója. Az *ern1* (Middleton et al., 2007) és *nin* (Vernie et al., 2015) mutánsok fenotípusát is csak részlegesen sikerült komplementálni, hasonlóan az *ief-1* mutánshoz. A másik magyarázat szerint az általunk előállított saját/natív promóter konstrukciók nem tartalmazzák a gén működéséhez szükséges összes szabályozó elemet és a gén termékére később is szükség van. Erre jó példa a *NIN* gén szabályozása, amelynek pontos regulálásához még az 5 kilobázis hosszúságú natív promóter sem elegendő (Liu et al., 2019). A konstitutív kifejeződést biztosító promóterek esetében (mint amilyen pl. az erős vírus p35S promóter) a folyamatosan magas szintű kifejeződés okozhat problémát.

Az általunk azonosított IEF fehérje szekvenciájának analizíse nem sokat árul annak funkciójáról. Az *IEF* gén egy a pillangósvirágúakra specifikus kisméretű fehérjét kódol, amelyen egy konzervált, NES motívumot hordozó domén található a C-terminális végén. Ez a domén az IEF és IEF-like fehérjéken egyaránt megtalálható. Még érdekesebb azonban a coiled-coil régió, ami a homológok vizsgálata alapján úgy tűnik, kizárólag a pillangosvirágú IEF fehérjékben található meg. Ezen régió szimbiózisban betöltött szerepének további vizsgálata mindenképpen indokolt. Az IEF fehérje sejtmagi és citoplazmatikus lokalizációja arra enged következtetni, hogy fehérje-fehérje komplexekben, vagy akár transzkripciós komplexekben tölt be funkciót. Az IPD3-ról, amelyet szinten egy coiled-coil régiót tartalmazó fehérjeként aposztrofáltak bebizonyosodott, hogy egy transzkripciós faktor (Limpens and Bisseling, 2014;Singh et al., 2014;Cerri et al., 2017). Elképzelhető, hogy az IEF funkciója is hasonló lehet.

Az elérhető génexpressziós adatbázisok és RNS szekvenálási adatok elemzéséből kiderült, hogy az általunk azonosított gén a rhizóbium által termelt NF hatására indukálódik. Annak érdekében,

hogy a szimbiotikus interakció során vizsgáljuk; mikor és hol expresszálódik a gén, promóteranalízis kísérleteket végeztünk. Megállapítottuk, hogy az *IEF* a szimbiotikus interakció egy igen rövid szakaszában, mindössze két napig mutat aktivitást és ez az aktivitás csak az epidermisz sejtekre korlátozódik az infekciós fonál kialakulásának és fejlődésének időszakában. Emellett bizonyítottuk, hogy a szimbionta partner által termelt NF felelős az *IEF* indukciójáért. A rhizóbium baktériummal történő fertőzést követő lokális indukció feltételezhetően azért figyelhető meg, mert nem az összes epidermisz sejtben történik a fertőzés, csak bizonyos epidermisz sejtekben indul meg az invázió folyamata, ahol az NF lokálisan szabadul fel. Ezzel szemben az NF tartalmú extraktummal való inkubáció egy mesterséges körülmény, melyben mindenhol jóval nagyobb koncentrációban van jelen a szignál molekula.

Az általunk kapott promóteraktivitás jó korrelációt mutat a mutáns növényen megfigyelt fenotípussal. Ezek alapján feltételezhető, hogy az IEF a szimbiózis igen korai szakaszában és rövid időintervallumban szükséges az infekciós fonál fejlődéséhez az epidermiszben.

A NIN és az ERN transzkripciós faktorok bizonyultak eddig az NF szignálút alsó elemeinek (Singh et al., 2014;Cerri et al., 2017), melyek további gének szabályozásáért felelősek (Soyano et al., 2013;Kawaharada et al., 2017b). Az *IEF* NF indukciója az *ERN1* és az azt reguláló *DMI3, IPD3, NSP2, LYK3* és *NORK* gének mutáns növényeiben nem volt detektálható, míg a *NIN* transzkripciós faktorban mutáns növényben a vad típushoz hasonló epidermisz specifikus aktivitást figyeltük meg. Ezek alapján elmondható, hogy az *IEF* közvetve, vagy közvetlenül az ERN1 transzkripciós faktor szabályozása alatt áll és epidermisz specifikus regulálása nem függ a NIN transzkripciós faktortól.

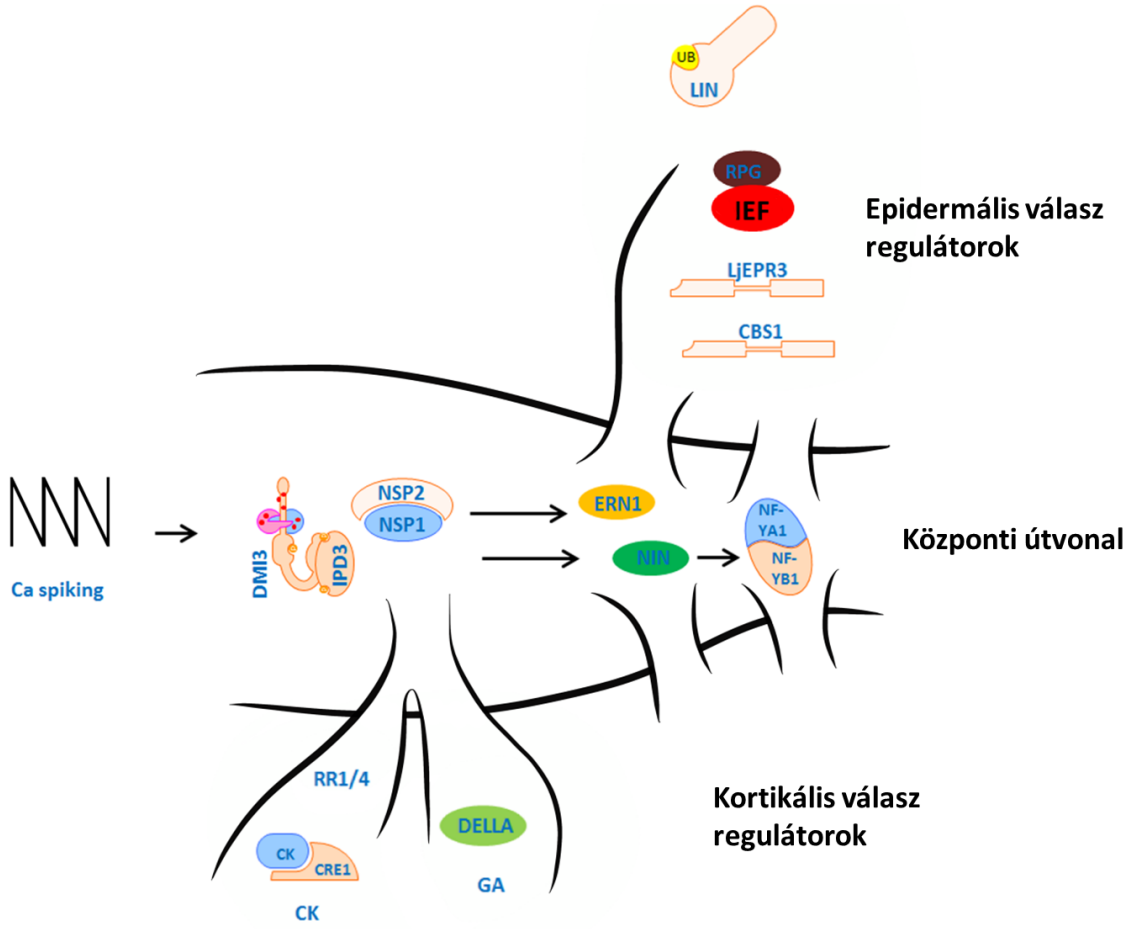
A bevezetésben bemutatásra került, hogy a NIN és ERN1 transzkripciós faktorok a közös szignálút elemei. Az általunk azonosított *IEF* azonban, legalábbis promóteraktivitását és fenotípusát vizsgálva inkább csak az epidermális válaszok regulátorának tűnt. Az autoaktív DMI3 közvetítette spontángümőzést és *pENOD11* promóteraktivitást vizsgálva a mutánsban megállapítottuk, hogy az IEF nem játszik szerepet a gümőorganogenezis programjában, az kizárólag az epidermális válasz regulátorának tekinthető.

Az *IEF* gén szabályozása ezek alapján komplexnek vagy összetettnek tűnik. A szimbiotikus interakció során kizárólag az epidermiszben indukálódik és a szimbiotikus interakció későbbi gümőfejlődési szakaszában már nem aktív, vagy csak nagyon alacsony szinten fejeződik ki. Tehát fő feladata a szimbiotikus interakció egy igen rövid periodusára, az infekciósfonál kialakulására és irányítására korlátozódik.

Több, eddig azonosított szimbiotikus fehérjével vizsgáltuk az IEF esetleges kölcsönhatását. Ezek közül egy esetben, az RPG esetében sikerült kimutatnunk pozitív interakciót. Az *RPG* – amely szintén az NF szignálútvonal tagja – génben mutáns növény fenotípusa nagy hasonlóságot mutat

az *ief-1* fenotípusával. Az RPG és az IEF is az infekciós fonál fejlődéséhez szükséges az epdermális válasz során. Ugyanakkor az *RPG* magas expressziót mutat a gümőben is. Elképzelhető, hogy az IEF-RPG komplex a szimbiózis kezdeti szakaszában az infekciós fonál fejlődéséhez kell, míg az RPG önmagában, vagy más eddig még nem azonosított partnerrel a szimbiózis későbbi szakaszához is szükséges és más feladatot lát el.

Összefoglalva, az általunk kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az IEF fehérje funkciójára a gyökérszőrben van szükség az infekicós fonál fejlődése során, feltételezhetően az RPG fehérjével komplexben. Az RPG fehérjét egy miozin típusú fehérjének prediktálják és tudjuk, hogy a mikrotubulus átrendeződéseknek fontos szerepe van az infekciós fonál fejlődésében, a sejtmag és a formálódó infekciós fonál összekapcsolásában. Elképzelhető, hogy a citoplazmában az RPG-IEF fehérje komplex ehhez a folyamathoz szükséges. Másik lehetőség, hogy az IEF fehérje a kapcsolatfelvétel következő szintjében játszik fontos szerepet. Tudjuk, hogy az infekciós fonál fejlődése során a rhizóbium sejtfelszíni poliszacharidoknak fontos szerepe van ebben és az azonosításra került LjEPR3 exopolysaccharide receptor (Kawaharada et al., 2015) ezeknek a poliszacharidoknak az érzékeléséhez szükséges az infekciós fonál fejlődése során. Könnyen lehet, hogy a LjEPR3 receptor kináz alatt a citoplazmában és esetleg a sejtmagban, mint jeltovábbító szerepe van az IEF és RPG fehérjéknek. Az is elképzelhető, hogy az IEF az RPG fehérjével közösen transzkripciós faktor komplexként viselkedik. Ehhez valamelyik fehérje jellegzetes aktiválására van szükség, hiszen az élesztő két hibrid kísérletekben egyik fehérje sem mutatott transzkripcionális autoaktivitást. Vagy egy eddig nem azonosított interakciós partner szükséges az aktivátor funkcióhoz.
Az általunk azonosított, a funkcionális analízisek alapján ***I****nfection-related* ***e****pidermal* ***f****actor* (***IEF***) névre keresztelt gén tehát egy a bakteriális invázió során az infekciós fonál fejlődéséhez elengedhetetlen, ugyanakkor a gümőfejlődés folyamatához nem szükséges, felételezhetően a NIN és ERN1 transzkripciós faktor regulálása alatt álló, illetve az RPG-vel funkcionális kapcsolatban lévő fehérjét kódol. Ezek alapján a bevezetésben vázolt modellen egyértelműen az epidermális válasz regulátorok csoportjába sorolható, így az *IEF* génnel kiegészítve 6.2. ábrán látható módon módosítom a bevezetőben bemutatott modellemet.



6.2. ábra. Az NF közvetítette szignál útvonal új modellje kiegészítve az általunk azonosított *IEF* génnel. A központi útvonal elemei egyaránt szabályozzák az epidermális és kortikális útvonalakat is, míg az epidermális és kortikális válasz regulátorok elemei specifikusak az adott útvonalra.

6.3. A *NAD1* két új álléljának azonosítása és jellemzése

A *NAD1* génhez két mutáns jellemzésével jutottunk el: az általunk azonosított *nad1-4* vonalban mutációt szenvedett gén megegyezett a Kaló Péter Gödöllöi csoportjában azonosított 7Y mutánsban azonosított génnel (Domonkos et al., 2013). Ezt követően közösen, kooperációs munka keretében folyattuk a két vonal jellemzését.

Időközben egy másik, tőlünk független csoport is azonosította ugyanezt a gént, innen ered a *NAD1* elnevezés is (Nodules with Activated Defense 1(Wang et al., 2016). Az általunk azonosított és jellemzett két mutáns vonalat a *NAD1* gén két új alléljaként publikáltuk egy társszerzős közleményemben (Domonkos et al., 2017).

A *nad1-3* és *nad1-4* mutánsokban, a rhizóbium baktérium lefűződését követően erős védekezési válasz indul be a „baráti" szimbionta baktériumok ellen. A védekezési reakciók következtében a rhizóbium baktériumok differenciációja nem megy végbe, sőt a fenotípus következményeként a baktérium sejtek elpusztulnak.

A kompelementációs kísérletek elvégzése során kiderült, hogy a gén szabályozásába, feltételezhetően a képződő mRNS stabilitásában vagy szabályozásában a nem transzlálódó régiónak fontos szerepe van.

A promóteraktivitás vizsgálata során egyértelművé vált, hogy a gén a rhizóbium baktériumokat tartalmazó növényi sejtekben expresszál. Ez a promóteraktivitás egybevág a fenotípus információkkal, ami alapján feltételezhető, hogy a gén termékére a baktériumok lefűződését követően van szükség.

6.4. Az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának funkcionális analízise

A két GRAS típusú transzkripciós faktor, az NSP1 és NSP2 fehérjék heterodimerikus komplexet alkotnak és különböző szimbiotikus gének szabályozásában játszanak kulcsszerepet (Hirsch et al., 2009). Az NSP1-NSP2 komplex megfelelő működése elengedhetetlen a gyökérszőrgörbülés és infekciós fonál kialakulásához, illetve a kéregsejtek osztódási képességének visszanyeréséhez, és ezzel a gümőorganogenezis beindításához (Catoira et al., 2000;Oldroyd and Long, 2003;Kalo et al., 2005;Smit et al., 2005).

Disszertációmban az *NSP2* gén két pontmutáns alléljának jellemzését és funkcionális analízisét mutatom be, melyek az NSP2 VHIID konzervált doménjében hordoznak 1-1 aminosavcserét eredményező pontmutációt és az eredmények egy elsőszerzős közleményemben kerültek publikálásra (Kovacs et al., 2021).

Az *nsp2-6* mutáns allélt a *M. truncatula* gyors neutron besugárzásával előállított mutáns populáció vizsgálata során azonosították (Kontra-Kováts et al., 2019). A gyors neutron besugárzás általában kisebb-nagyobb deléciókat okoz a genomban és bár *Arabidopsis*-ban ezzel az eljárással pontmutánsokat is azonosítottak (Belfield et al., 2012), *M. truncatula*-ban nem írtak le hasonló esetet. Nem lehet kizárni azt sem, hogy az *nsp2-6* mutáns allél egy természetes mutáció eredménye. Az *nsp2-6* mutáns az *NSP2* gén kódoló régiójában hordoz egy nukleotid cserével járó pontmutációt, ami a képződő fehérje egyik konzervált régiójában, a VHIID motívumban eredményez egy aminosavcserét. Az NSP2 fehérje 244. pozíciójában lévő aszparaginsav egy hisztidinre cserélődött le ebben a mutánsban. Az általunk vizsgált *nsp2-6* mutáns fenotípusa teljes mértékben megegyezik a null vagy knock-out (KO) mutánsnak tekintett *nsp2-2* mutáns fenotípusával (Oldroyd and Long, 2003). Az *nsp2-2* és *nsp2-6* mutáns növények gyökerein abnormális gyökérszőrdeformációkat figyelhetünk meg és a deformáció helyén a rhizóbium baktériumokat a gyökérszőr felszínén találjuk nagy számban, azonban a gyökérszőrgörbülés és ezzel a baktériumok csapdázása nem következik be. Emellett a belső kéregsejtek sem nyerik vissza osztódóképességüket és ezzel a gümőorganogenezis folyamata sem indul be. A fenotípusban megfigyelhető hasonlóságok mellett ezekben a mutánsokban az NF jelátviteli útvonal hasonló mértékben gátlódik és az NSP2 transzkripciós faktor célgénjeinek indukcióját nem figyelhetjük meg.

Munkánk során megállapítottuk, hogy az NSP2 fehérje D244H mutációja gátolja az NSP1-NSP2 heterodimer kialakulását, mind élesztő két-hibrid rendszerben, mind dohánylevélben végzett

BiFC kísérletek során, hasonlóan az NSP2 VHIID doménjét nem tartalmazó deléciós változataihoz (Hirsch et al., 2009).

Az *nsp2-6* infekciós defektusa mellett megállapítottuk, hogy a gümőorganogenezis folyamata szintén blokkolt ebben a mutánsban. Ezek az adatok alátámasztják, hogy az *nsp2-6* az *NSP2* gén erős mutáns allélja.

A VHIID motívum feltételezett funkciói közé tartozik a fehérje–DNS interakció kialakulásának elősegítése (Pysh et al., 1999) és a GRAS domén struktúrájának megőrzése, illetve a konformációjának biztosítása (Li et al., 2016). Az *nsp2-6* szimbiotikus fenotípusának, illetve az NSP1 fehérjével való interakciójának vizsgálata alapján kijelenthetjük, hogy az NSP2 fehérje 244. pozíciójában lévő hisztidin aminosavnak kulcsfontosságú szerepe van az NSP2 funkciójának biztosításában.

Emellett disszertációmban bemutatásra kerül, hogy $NSP2_{E232K}$ és $NSP2_{D244H}$ mutációk eltérő mértékben befolyásolják az NSP1 fehérjével a kölcsönhatást. Ez a különbség jól magyarázza az *nsp2-3* ($NSP2_{E232K}$) és *nsp2-6* ($NSP2_{D244H}$) mutánsok vizsgálatával kapott eltérő génexpressziós adatokat és az eltérő szimbiotikus fenotípust. A két pontmutáció vizsgálatával kapott különbségek rávilágítanak az NSP2 fehérje 232. pozícióban lévő glutaminsav és a 244. pozíciójában lévő hisztidin fontosságára. Az NSP2 és a többi GRAS típusú transzkripciós faktorra egyaránt jellemző a GRAS domén jelenléte, amely öt különböző jellegzetes motívumot tartalmaz (LHR1, VHIID, LHRII, PFYRE és SAW motívumok), melyek a motívumokban található konzervált aminosavakról lettek elnevezve. A Scarecrow (SCR) és egy Scarecrow-szerű fehérje (SCL7) GRAS doménjének kristályszerkezeti vizsgálatával megállapították (Li et al., 2016;Hakoshima, 2018), hogy mindegyik GRAS domén tartalmaz egy úgynevezett α-helikális sapkaszerű részt és egy α/β központi domént, illetve az utóbbi tartalmaz továbbá tíz α-hélixet és kilenc β-redőt. Az *nsp2-6* mutánsban található D244H mutáció éppen az előbbi kilenc β-redőből érinti az elsőt, melynek úgy tűnik, fontos szerepe van a GRAS domén konformációjának megőrzésében. Az *nsp2-3* mutánsban található E232K mutáció ellenben a tíz α-hélix közül az ötödikben található. Az alapján, hogy az $NSP2_{E232K}$ és az $NSP2_{D244H}$ mutációk ilyen eltérő mértékben befolyásolják az NSP1 fehérjével való interakciót kijelenthetjük, hogy a D244H mutációnak sokkal nagyobb hatása van az NSP2 fehérje struktúrájára, mint az E232K mutációnak.

Az *nsp2-6* mutáns fenotípusától eltérően, az *nsp2-3* mutáns gyökerein kis fehér gümőket figyeltek meg, és ezért gyenge mutáns allélként hivatkoznak rá (Kalo et al., 2005). A mutáns részletes fenotípus jellemzése azonban ezidáig nem történt meg. Az *nsp2-3* mutáns gyökerein gyökérszőrgörbüléseket figyeltünk meg a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követően. A görbült gyökérszőrben fejlődő infekciós fonalak ugyanakkor abnormális morfológiát

mutattak, vastagok voltak, illetve a hasonlóan a *vapyrin* mutánshoz (Murray et al., 2011) az infekciós fonál falai kanyargósak voltak. Azonban az *nf-ya-1* (Laporte et al., 2014) és *ipd3-1* (Horvath et al., 2011) mutánsoktól eltérően ezek az infekciós fonalak nem mutattak megduzzadt, kanyargós és hólyagszerű morfológiát. Emellett az előző mutánsoktól eltérően az infekciós fonalak az *nsp2-3* mutánsban képesek eljutni a kéregsejtekig, ahol a baktériumok kijutnak az infekciós fonalakból és elárasztják a formálódó gümőprimordiumokat.

A *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követően, az *nsp2-3* mutáns gyökerein baktériumokkal teli gümőprimordiumokat figyelhettünk meg, ami részben ellentmond a korábbi megfigyeléseknek, amikor a szimbiotikus fenotípust *S. meliloti* 1021 baktériummal való fertőzést követően vizsgálták (Kalo et al., 2005). Ezért a gümőfejlődés kinetikáját egymással párhuzamosan vizsgáltuk a kevésbé hatékony (*S. meliloti* 1021) és kompatibilisebb (*S. medicae* WSM419) szimbiotikus partnerrel (Terpolilli et al., 2008) történő fertőzést követően. A vad típusú és az *nsp2-3* mutáns közötti különbség a *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követő 10. napon látszott először. Emellett a működő gümők alacsonyabb számát figyeltük meg a későbbi időpontokban. Ezek arra engednek következtetni, hogy a gümőfejlődés kinetikája késleltetett ezzel a szimbiotikus partnerrel történő fertőzés esetében. A *S. medicae* WSM419 baktériummal való fertőzést követően formálódó rózsaszín gümők nitrogénkötési hatékonyságának megállapításához mértük a gümőkben lévő baktériumok nitrogenáz enzim aktivitását, illetve a szimbiotikus kondíciók között nevelt növények zöld részeinek szárazsúlyát. A *S. medicae* WSM419 baktériummal teli vad és *nsp2-3* mutáns gümők alapján mért nitrogenáz aktivitás szinte teljesen azonos volt, ami az $NSP2_{E232K}$ mutáns fehérje működőképességét bizonyítja. Azonban a késlekedő gümőfejlődés, a funkcionáló gümők alacsony száma, a génexpressziós adatok és a gümőorganogenezis programjának eltérése az *nsp2-3* mutánsban arra enged következtetni, hogy a $NSP2_{E232K}$ mutáns verziója nem működik megfelelően. A gümőfejlődés kinetikájának késése még egyértelműbb, amikor a kevésbé hatékony *S. meliloti* 1021 szimbiotikus partnerrel vizsgáltuk az *nsp2-3* mutáns fenotípusát, ami felveti a törzsfüggő fenotípus lehetőségét. Az *S. meliloti* 1021 és a *M. truncatula* A17 közötti nem optimális szimbiotikus kapcsolatot már többször leírták (Terpolilli et al., 2008;Kazmierczak et al., 2017) és a kevésbé hatékony szimbiotikus partner helyett a *S. medicae* WSM419 baktérium használata jobban elfogadottá vált a szimbiotikus tesztek során. A *S. meliloti* 1021 hatékonyan indukálja a gümőorganogenezis folyamatát, de a szimbiotikus gümősejtek és a rhizóbium baktériumok differenciációja kevésbé megy végbe ezzel a szimbiotikus baktériummal történő fertőzés esetén (Kazmierczak et al., 2017).

Bár a *S. meliloti* 1021 és a *M. truncatula* A17 közötti kevésbé hatékony szimbiotikus interakció genetikai háttere még nem ismert, eredményeink arra engednek következtetni, hogy a törzsfüggő

szimbiotikus nitrogénkötés hatékonysága valószínűleg már az NF jelátviteli útvonal során megjelenik és nem csak a késői folyamatok során jelent különbséget a különböző genotípusok között. Eredményeink továbbá arra engednek következtetni, hogy az NF szignál útvonalnak és azok komponenseinek nem csak a korai szimbiotikus interakció során van megkérdőjelezhetetlen szerepe, hanem a szimbiotikus interakció késői szakaszában is szükségesek.

Az érett gümő különböző részeinek lézer mikrodisszekciós módszerrel történő szétválasztását követő RNS szekvenálási adataiból kitűnik (Roux et al., 2014), hogy az *NSP1* és *NSP2* transzkripciós faktorok egyaránt aktívak a kifejlett gümő csúcsi részében. Mindkét gén túlnyomó részben a gümő merisztémájában és a felső infekciós zónájában expresszál. Ez továbbra is támogatja azt az elképzelést, hogy az *NSP2* génnek szerepe van a gümősejtek differenciációjában a szimbiotikus interakció későbbi szakaszában. A NF szignál útvonal szerepének fontosságát a szimbiotikus interakció késői szakaszában már más gének esetén is felvetették, a *DMI2* (Limpens et al., 2005) és az *NSP2* célgénjeként ismert *NIN* esetében is (Liu et al., 2021). Ezeknek a géneknek a csökkent aktivitása egyaránt szimbioszómák kilakulásának hibáját eredményezi. Az eredményeink bizonyítják, hogy az *NSP2* gén a korai szimbiotikus interakció szabályozása mellett, fontos szerepet tölt be a szimbiotikus kapcsolat későbbi lépéseinek szabályozásában is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai – és a Növénybiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik munkám során segítségemre voltak. Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, a Genetikai Intézet igazgatójának, valamint Dr. Vass Imrének, a Növénybiológiai Intézet igazgatójának, hogy biztosították a kutatáshoz szükséges feltételeket.
Köszönettel tartozom témavezetőimnek. Dr. Endre Gabriellának köszönöm, hogy elkezdhettem doktori tanulmányaimat csoportjában valamint, hogy doktori dolgozatomat átolvasta és szakmai tanácsaival ellátta. Dr. Kaló Péternek hálával tartozom segítségéért, támogatásáért, ami nélkül nem tudtam volna megszerezni doktori fokozatomat. Köszönöm a belém vetett bizalmát, szakmai tanácsait munkám és doktori dolgozatom kapcsán egyaránt.
Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Kondorosi Évának és Dr. Kereszt Attilának, hogy a doktori dolgozatomat átolvasták és szakmai tanácsaikkal elláttak.
Köszönet illeti a volt Lucerna Genetika és a jelenlegi Szimbiózis és Növénygenomika Csoport valamennyi tagját a munkám során nyújtott segítségért. Külön szeretném megköszönni Dr. Kiss Ernőnek. Dr. Domonkos Ágotának és Jenei Sándornak, hogy megosztották velem tudásukat. Köszönöm továbbá Liptay Zsuzsannának a mindennapi segítségét a laborban végzett munka során.
Szeretnék köszönetet mondani a kollaborációs partnereknek: Dr. Laczi Krisztiánnak (SZTE – Biológus Tanszékcsoport, Biotechnológiai Tanszék) az acetilén-redukciós kísérletek elvégzése során nyújtott szakmai segítségéért, valamint Dr. Ferhan Ayaydinnak (Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine (HCEMM) a mikroszkópos vizsgálatok során nyújtott szakmai segítségéért.
Valamint szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak, de legfőképp feleségemnek a támogatást, biztatást és türelmet, melyet irányomba tanúsított ezidő alatt.

Mellékletek

Cél	amplifikálás célpontja	primerek	primerek szekvenciája	méret
szegregáló populáció genotipizálása	*ief-1* inszerció	fw (5` to 3`)	ATGGAGAAAAAGGTTGAGAACG	
		rev (5` to 3`)	GCAGCTTCTGGTCGGAGAC	405 bp
	ief-1 génspecifikus	fw (5` to 3`)	GCCAAAGCTTCACCCTCTAAAGCCT	
		rev (5` to 3`)	GCAGCTTCTGGTCGGAGAC	352 bp
	Medtr2g031750 génspecifikus	fw (5` to 3`)	GTGGAGGATTATGAGTTCAATGG	
		rev (5` to 3`)	CGATGAAACGAAAGAATGGTTG	716 bp
	Medtr2g031750 inszerció	fw (5` to 3`)	TCTGGATGAATGAGACTGGAGG	
		rev (5` to 3`)	CGATGAAACGAAAGAATGGTTG	542 bp
	nad1-4 inszerció	fw (5` to 3`)	GTTAGTGCCAAGATCACATATATTC	
		rev (5` to 3`)	TCTGGATGAATGAGACTGGAGG	434 bp
	nad1-4 génspecifikus	fw (5` to 3`)	GTTAGTGCCAAGATCACATATATTC	
		rev (5` to 3`)	CTAATCTCCATCCAAAGGTGCAG	705 bp
az IEF gén és promóterek klónozása	*MtIEF* ATG-STOP	fw (5` to 3`)	ATGGAGAAAAAGGTTGAGAACG	
		rev (5` to 3`)	TCATAACCCTAATGACCTCATACTC	762 bp
	MtIEF ATG-END	fw (5` to 3`)	ATGGAGAAAAAGGTTGAGAACG	
		rev (5` to 3`)	TAACCCTAATGACCTCATACTCATC	759 bp
	1.9 kb natív promóter	fw (5` to 3`)	CACGACCCCAATACATCCAC	
		rev (5` to 3`)	TATATAAATAATGAATAGGTGTTAATTG	1903 bp
	1.9 kb natív promoter + *MtIEF*	fw (5` to 3`)	CACGACCCCAATACATCCAC	
		rev (5` to 3`)	TCATAACCCTAATGACCTCATACTC	2665 bp
NSP2 klónozás	MtNSP2 ATG-STOP	fw (5` to 3`)	ATGGATTTGATGGACATGGATGCCATC	
		rev (5` to 3`)	CTATAAATCAGAATCTGAAGAAGAAC	1527 bp

Melléklet. 1. táblázat. A munkák során használt oligonukleotidok listája

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkcio	poz.
chr1:26091206-26091303	F	T	Medtr1g059940	eukaryotic-type carbonic anhydrase	E
chr1:52812750-52812806	F	T	Medtr1g116940	zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	E
chr2:1342573-1342717	R	T	Medtr2g008190	phosphatidylserine decarboxylase	I
chr3:35102925-35102982	F	T	Medtr3g077930	carbonic anhydrase family protein	I
chr5:12892381-12892439	R	T	Medtr5g030460	hypothetical protein	I
chr5:16768713-16768817	R	T	-	-	-
chr6:60215-60394	F	T	Medtr6g004000	actin-97	E
chr6:31445233-31445325	R	T	-	-	-
chr8:2007521-2007688	R	T	Medtr8g009055	UDP-glucosyltransferase family protein	E
chr8:467619-467753	F	T	Medtr8g006090	nodulin MtN21/EamA-like transporter family protein	E
chr8:45457496-45457637	R	T	Medtr8g107510	potassium transporter-like protein	5' UTR

Melléklet. 2. táblázat. A T00187B vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja, F: forward, R: reverse), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és pozíció (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR), amennyiben gént érint az inszerció

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkcio	poz.
chr2:43206171-43206256	F	M	Medtr2g100510	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like protein	E
chr3:36083248-36083382	R	T	Medtr3g079860	ribonuclease III domain protein? /DICER like	E

Melléklet. 3. táblázat. A Z004693B vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gént érint az inszerció

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkció	poz.
chr1:31319594-31319814		T	-	-	-
chr1:39254645-39254707	F	T	Medtr1g087720	DUF761 domain protein	E
chr2:12029763-12029923	F	T	Medtr2g031750	transmembrane amino acid transporter	E
chr3:10575344-10575503		T	-	-	-
chr4:14489225-14489400	F	M	Medtr4g040410	Pentatricopeptide repeat-containing protein	E
chr4:34574156-34574263	R	T	Medtr4g087875.2	hypothetical protein	3'UTR
chr5:10812110-10812257	R	T	Medtr5g026290	hypothetical protein	E
chr5:39568725-39568846		T	-	-	-
chr7:25835565-25835733		T	-	-	-

Melléklet 4. táblázat. Az F9451V (*ief-1*) vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), gén név, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gént érint az inszerció. Sárgával jelölve a fenotípussal ko-szegregáló mutáció.

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkcio	poz.
chr1:47902540-47902652	F	M	Medtr1g105980	transmembrane amino acid transporter family protein	E
chr1:48012386-48012555	F	M	-		
chr2:4346182-4346380	R	T	Medtr2g014920	LRR receptor-like kinase family protein, putative	I
chr3:50014642-50014823	F	M	Medtr3g108240	CHY and CTCHY and RING-type zinc finger protein	I
chr3:32989670-32989878	F	M	Medtr3g073180	nitrate reductase [NADH]-like protein	E
chr4:35229182-35229388	F	M	Medtr4g088605	TE in B3 DNA-binding domain protein's intron	I
chr4:35520527-35520709	F	M	Medtr4g088925	F-box protein	E
chr5:20272367-20272502	F	T	Medtr5g046240	RPAP1-like, carboxy-terminal protein	I
chr8:44679717-44679907	R	M	-	-	

Melléklet 5. táblázat. A G003808B vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gént érint az inszerció

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkcio	poz.
chr1:9029521-9029587	R	T	Medtr1g027290	flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	I
chr1:49919362-49919435	F	T	-	-	-
chr1:43067677-43067862	R	T	Medtr1g495705	GTP-binding elongation factor Tu family protein	3' UTR
chr2:14782089-14782203	F	T	Medtr2g437590	triose-phosphate transporter family protein	E
chr2:4815613-4815667	R	T	Medtr2g016010	hypothetical protein MTR_2g016010	I
chr2:26356498-26356564	R	T	Medtr2g062430	DUF946 family protein	E
chr3:33871812-33871918	F	T	Medtr3g074970	inactive purple acid phosphatase-like protein	I
chr3:5270179-5270341	F	T	-		
chr4:7604237-7604300	F	T	-		
chr4:38901220-38901291	R	T	Medtr4g094752	hypothetical protein ?	I
chr4:55706468-55706642	R	T	Medtr4g133130	oligopeptide transporter	I
chr5:5065853-5066007	R	T	Medtr5g014890	homeobox associated leucine zipper protein	E
chr7:8261938-8262015	F	T	Medtr7g024950	cysteine/histidine-rich C1 domain protein	3' UTR
chr8:8028085-8028221	R	T	Medtr8g022650	hypothetical protein	I
chr8:41301075-41301308	R	M	Medtr8g098815	1000 bp from the next gene's 3' end (Medtr8g098815.1)	
scaffold0392:14640-14856	R	M	Medtr0392s0020	nuclear transcription factor Y protein	E

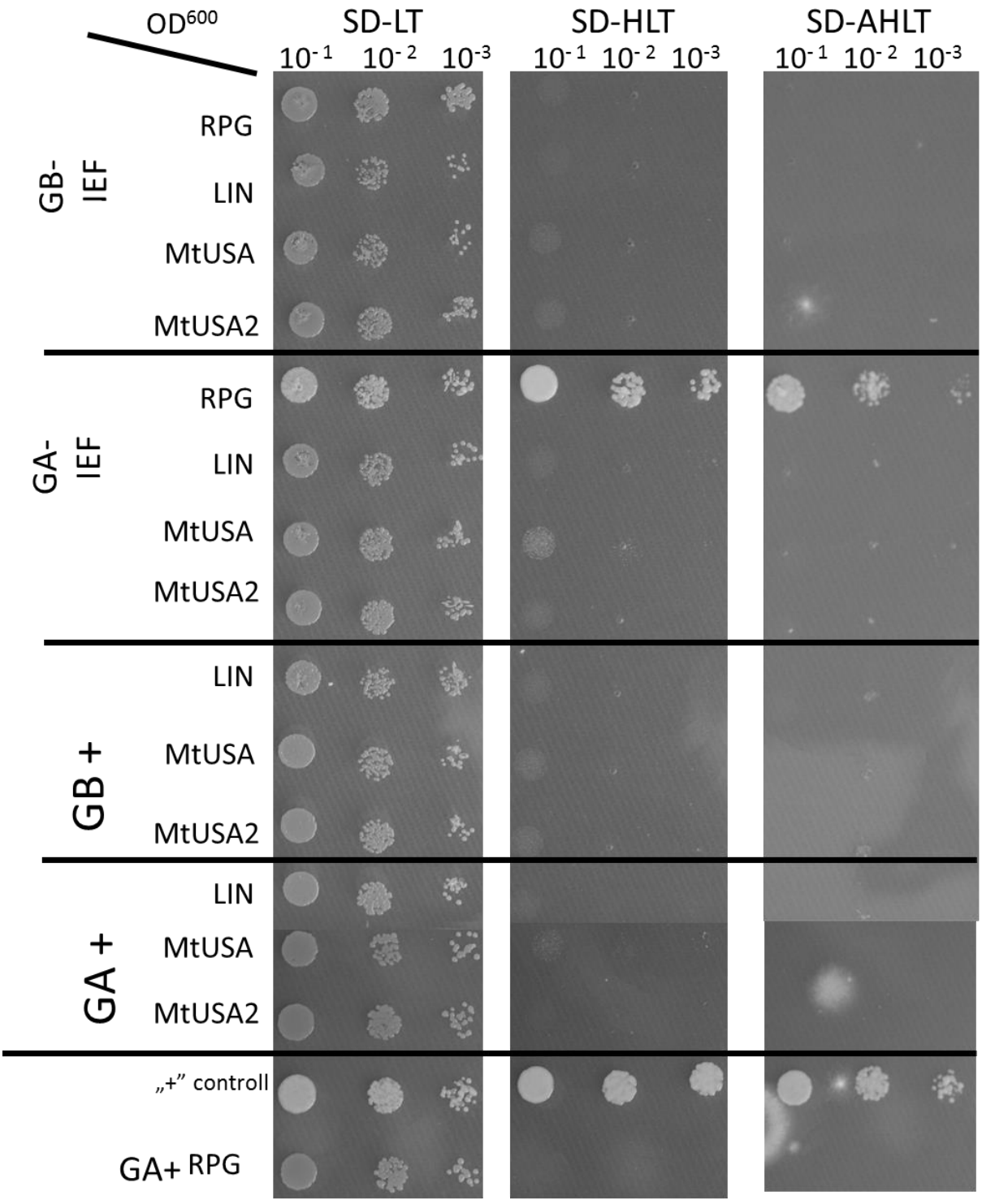
Melléklet 6. táblázat. A T00163H vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gént érint az inszerció

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkcio	poz.
chr1:37287342-37287492	F	T	Medtr1g083770	P-loop nucleoside triphosphate hydrolase superfamily	E
chr1:46399595-46399711	F	T	-	-	-
chr1:6757824-6758038	R	T	Medtr1g022010	histidine-tRNA ligase	E
chr1:1635898-1635989	R	T	-		-
chr2:6389836-6390022	F	T	-	-	-
chr2:822916-823080	F	T	-	-	-
chr2:41583915-41584047	F	T	Medtr2g097380	GRAS family transcription factor	E
chr2:27101456-27101621	F	M	Medtr2g063930	hypothetical protein	I
chr2:40382431-40382614	R	T	Medtr2g094600	GATA type zinc finger transcription factor family protein	5' UTR
chr3:47011270-47011394	R	T	Medtr3g102040	polyadenylate-binding protein	E
chr3:26414747-26414883	F	T	-	TE	-
chr3:29023149-29023362	F	M	-	between TEs	
chr4:31366583-31366716	F	M	Medtr4g080780	hypothetical protein	E
chr4:12712140-12712216	F	T	-	between TEs	-
chr4:24545258-24545452	F	T	-	-	-
chr4:1609867-1610034	F	T	Medtr4g008630	zeatin O-glucosyltransferase-like protein	U
chr4:55578362-55578493	F	T	Medtr4g132870	kinesin motor domain protein	I
chr4:44955499-44955667	F	M	-	-	-
chr4:52544331-52544497	F	M	-	-	-
chr4:48160098-48160215	R	T	-	Between TEs	
chr4:5346289-5346501	R	T	Medtr4g417260	verticillium wilt resistance-like protein ?	E
chr5:21286775-21286874	F	T	Medtr5g048670	replication factor-A protein 1	3' UTR
chr5:7841841-7841943	F	T	Medtr5g020520	late embryogenesis abundant domain protein	E
chr5:11177704-11177810	F	T	-	-	-
chr5:39409781-39410008	F	M	-	-	-
chr5:6515428-6515607	F	M	-	TE	-
chr5:5200908-5201083	R	T	-	TE	-
chr7:44708599-44708720	F	T	Medtr7g109360	DnaJ heat shock amino-terminal domain protein	5' UTR
chr7:7320744-7320876	F	T	Medtr7g022640	transmembrane protein, putative	5' UTR
chr7:5254701-5254774	F	T	Medtr7g016630	MADS-box transcription factor	I
chr7:23127600-23127772	R	T	Medtr7g063460	ribosomal protein S12/S23 family protein	E

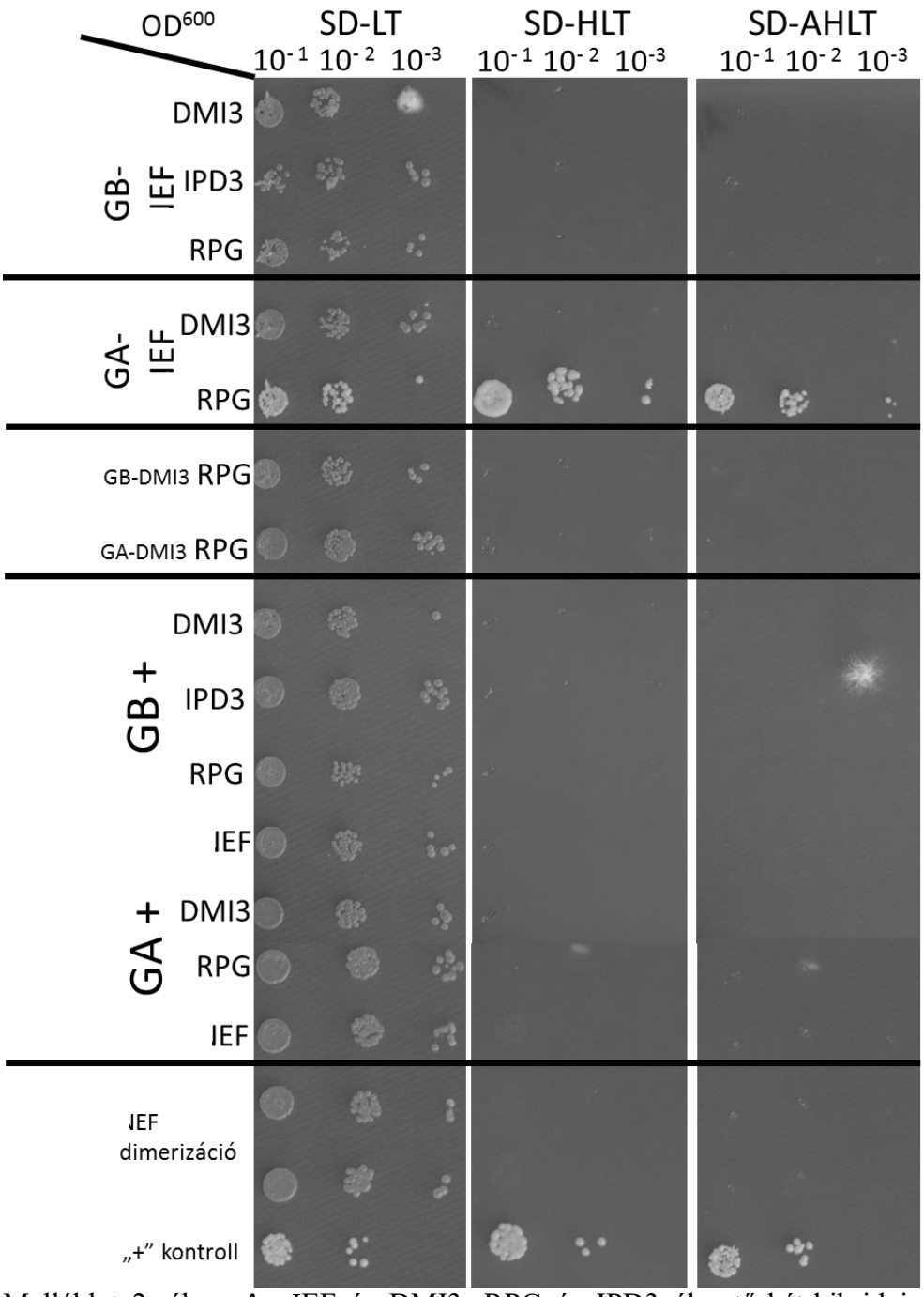
Melléklet 7. táblázat. Az N5896 (*nad1-4*) vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gén érint az inszerció. Sárgával jelölve a fenotípussal ko-szegregáló mutáció.

pozíció	ori	T/M	génnév	feltételezett funkció	poz.
chr6:1226728-1227133	F	T	Medtr6g006750.1	hypothetical protein	E
chr6:9690985-9691063	F	T	Medtr6g027730	2-aminoethanethiol dioxygenase-like protein	I
chr2: 3916892-3917245	R	T	Medtr2g014050.1	late embryogenesis abundant domain protein	E

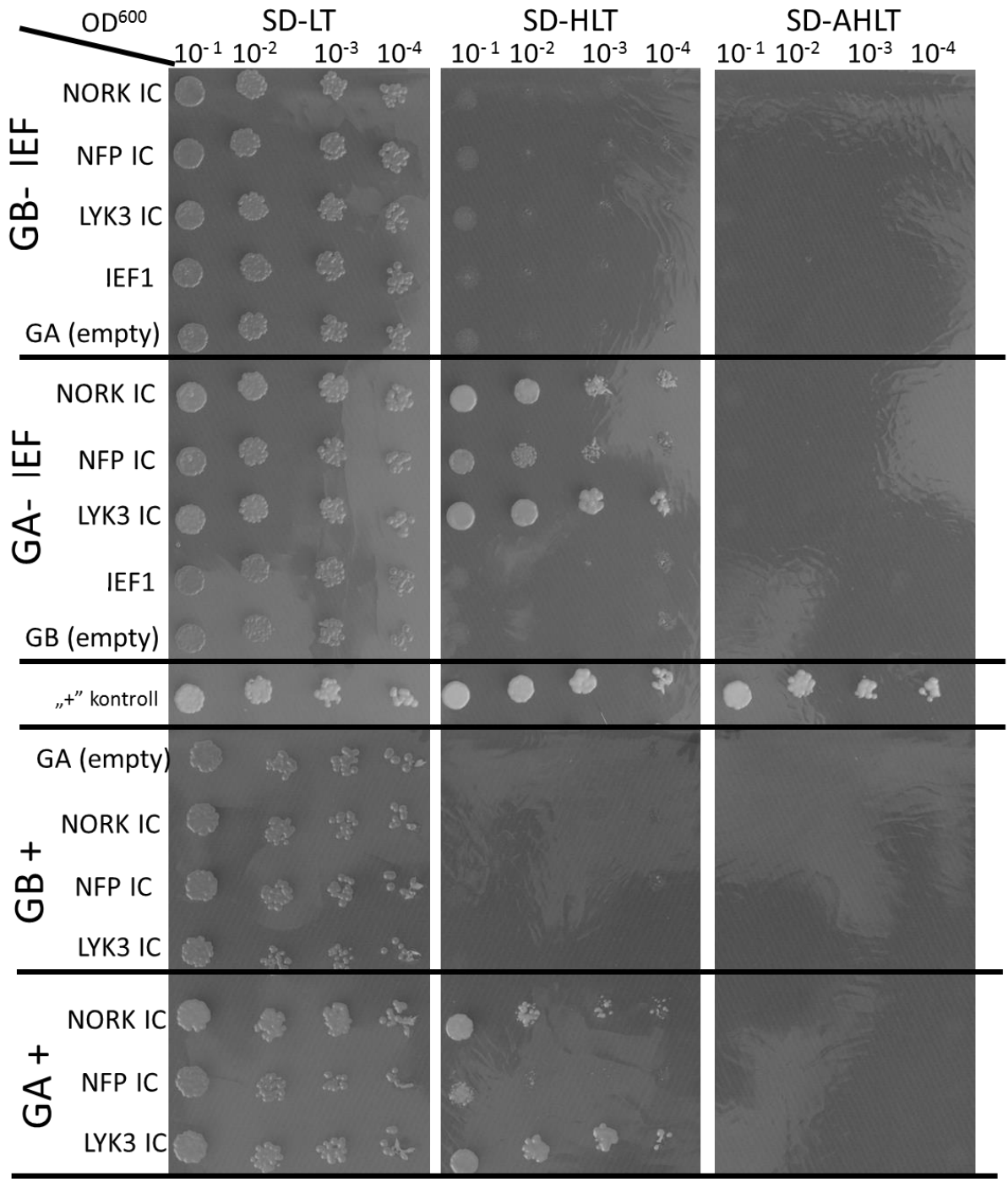
Melléklet 8. táblázat. A Z004801BS vonalban azonosított inszerciók. (inszerció genomi pozíciója, ori (inszerció orientációja), T/M (Tnt1 vagy MERE1 inszerció), génnév, funkció és poz. (E:exon, I: intron, 5'UTR é 3'UTR) amennyiben gént érint az inszerció



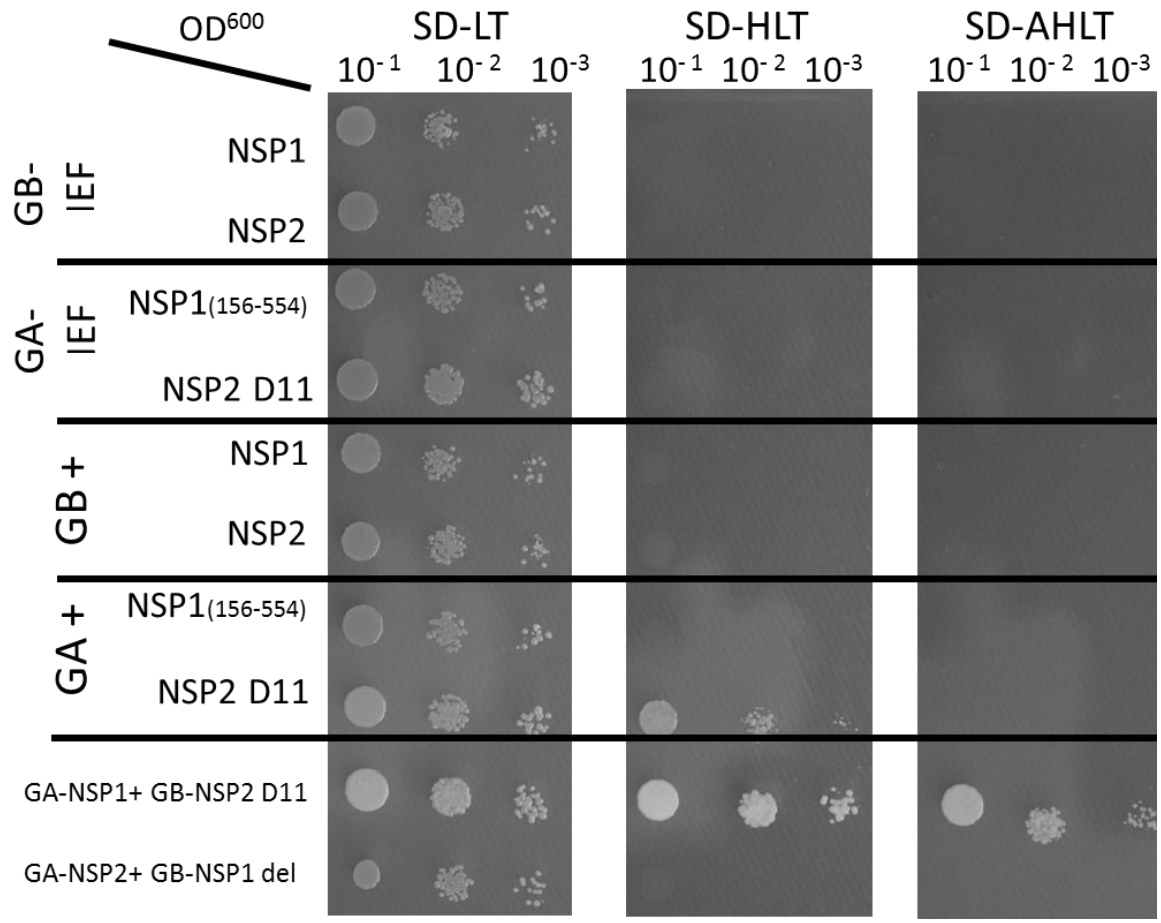
Melléklet 1. ábra. Az IEF és LIN, RPG, MtUSA, illetve MtUSA2 élesztő-két-hibrid interakció tesztje. „+" kontroll: NSP1+NSP2 interakció.



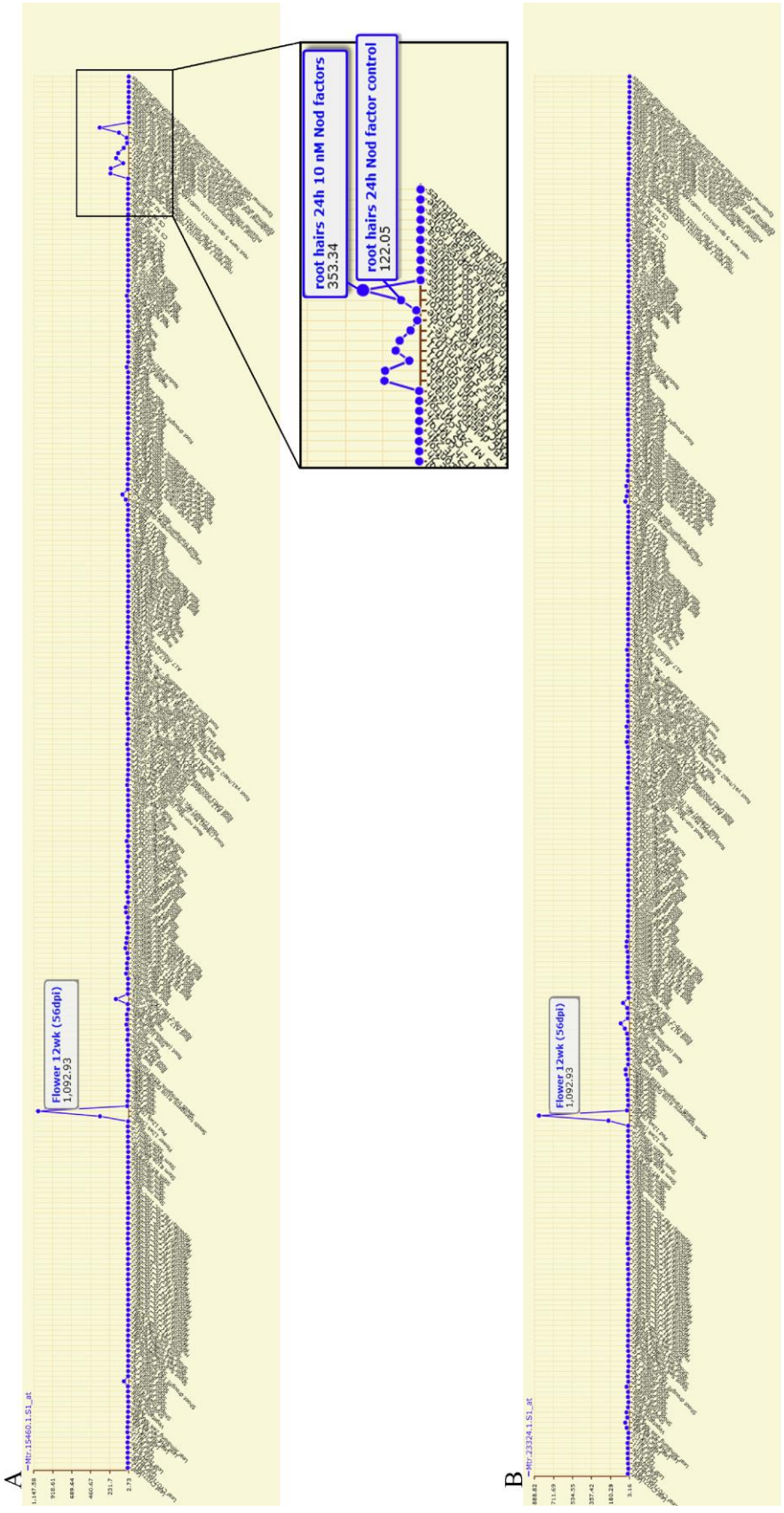
Melléklet 2. ábra. Az IEF és DMI3, RPG és IPD3 élesztő-két-hibrid interakció tesztje. „+" kontroll: NSP1+NSP2 interakció .



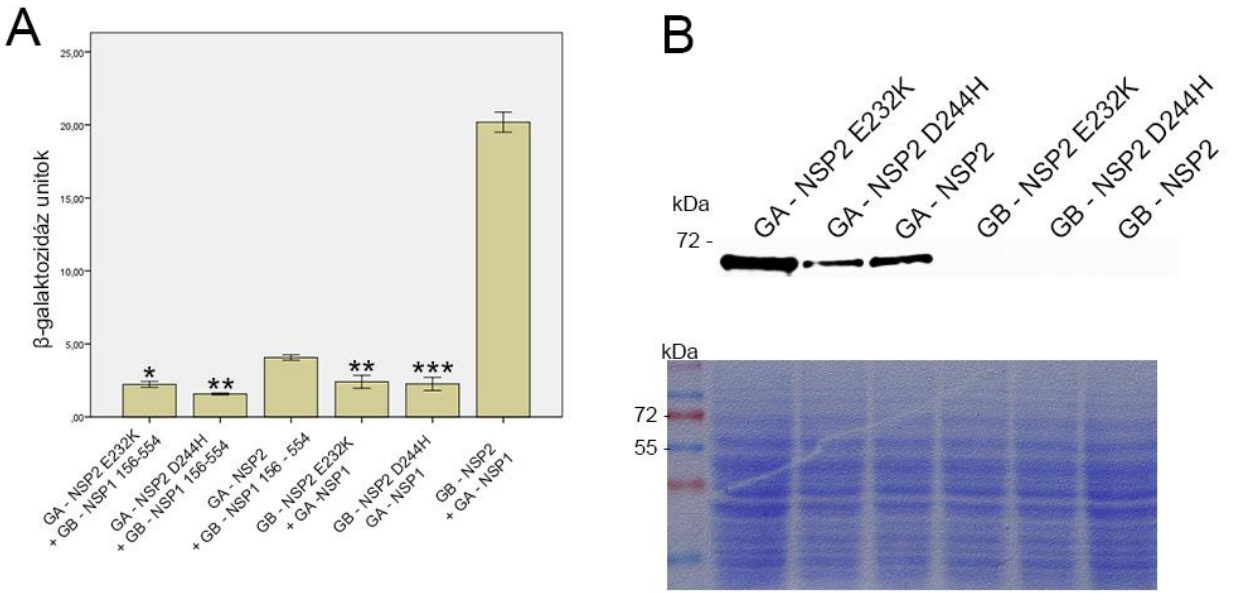
Melléklet 3. ábra. Az IEF és NORK IC, NFP IC és LYK3 IC élesztő-két-hibrid interakció tesztje. „+” kontroll: NSP1+NSP2 interakció.



Melléklet 4. ábra. Az IEF és NSP1 és NSP2 élesztő-két-hibrid interakció tesztje



Melléklet 5. ábra. Az *MtIEF* (gén ID: Medtr1g087720, probaset ID: Mtr.15460.1.S1_at) (A) és *MtIEF-like* (gene ID: Medtr7g109300, probaset ID: Mtr.23324.1.S1_at) (B) génexpressziója az Gene Expression Atlas (MtGEA) (https://mtgea.noble.org/v2/) alapján.



Melléklet 6. ábra. A, A vad típusú és pontmutáns NSP2 formák NSP1 fehérjével való kölcsönhatás kvantifikációja β-galaktozidáz enzimaktivitás mérés alapján. A vad és mutáns NSP2 fúzios formák (Gal4 aktivációs (GA) vagy DNS kötő (GB) doménnel) kölcsönhatási tesztelése az NSP1 fehérjével *S. cerevisiae* élesztőben. Minden érték három technikai ismétlés átlaga, a szórás értékek a standard errort jelentik. A csillagok a student féle t-teszt alapján számolt szignifikancia különbséget jelentik: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01 and ***P ≤ 0.001. B, A vad és mutáns NSP2 formák detektálása az élesztőből származó crude extraktumból. Az NSP2 fehérje különböző formáinak kimutatása western blottal a Gal4 aktivációs doménhez fúzionáltatott α-HA antitest segítségével. A Gal4 DNS-kötő motívumhoz fúzionáltatott vad és mutáns NSP2 formák, mint negative kontrollok szerepeltek a westernblot során. A coomassie brillian blue (CBB) festett gél a westernblothoz használt géllel azonos mennyiségű fehérjét tartalmaz.

Summary

Legumes (*Fabaceae*) are able to establish symbiotic associations with nitrogen-fixing bacteria collectively termed as rhizobia. Our main objective was to identify novel symbiotic plant genes essential for the nitrogen-fixing symbiotic interaction between *M. truncatula* and *Sinorhizobium medicae*. In this dissertation, I aimed the identification and characterization of novel mutant lines and the impaired genes, which are required for the nitrogen-fixing symbiotic interaction. The other objective was the comparative analysis of the two point mutant alleles of the already known ***N**odulation **S**ignaling **P**athways **2*** (***NSP2***) gene.

Identification of novel symbiotic mutant lines and symbiotic genes

By screening the collection of the European *Tnt1* insertional mutant collection, seven new symbiotic mutant lines have been isolated. These mutants can be impaired in known and hopefully novel symbiotic genes targeted by the insertion. We have identified 129 different insertional events in the 7 mutant lines and by analyzing the genomic position of these insertions, we selected 59 candidate genes which might cause the symbiotic phenotype in the mutant lines. Using the combination of classical genetic and next-generation sequencing methods, we identifed the impaired symbiotic genes in two mutant lines.

Identification and characterization of the Infection-related Epidermal Factor (*IEF*) gene.

The first mutant line was characterized as an infection mutant. We observed that the bacteria failed to invade the developing nodule in this mutant line. The detailed phenotypic analyses revealed that the earliest responses to bacteria, the root hair curling and forming nodule primordia are intact in this mutant plant. However, the formation of the tube-like structure called infection thread is impaired in the mutant, indicating that the mutated gene is required for the formation and progression of the infection threads. In addition, we found that the plant defense responses were activated next to the invasion events blocked in this mutant. The symbiotic function of the gene was confirmed by complementation experiments. Based on the results described in the thesis, we termed this gene ***I**nfection-related **E**pidermal **F**actor* (***IEF***). Monitoring the promoter activity of the *IEF* gene during the symbiotic interaction, we demonstrated that it is active only in the epidermis within a very short period of time following

inoculation with rhizobia or NF treatment. Moreover, we provided evidence that the induction of *IEF* is regulated by NFs. We have also checked the activity of the *IEF* promoter upon NF induction in mutants of known symbiotic genes. We could position this new symbiotic gene, *IEF* in the hierarchy of the already known components of the NF signal transduction pathway and we foumd that *IEF* acts downstream to the *ERN1* transcription factor. In order to monitor the nodule organogenesis in the *ief* mutant, the autoactive form of DMI3 was introduced into the roots of the mutant plants. Spontaneous nodule formation was induced on *ief* roots indicating that the nodule organogenesis was not affected in the mutant and *IEF* is not required for induction of nodule formation. We found that the IEF protein is localized in the cytosol and in the nucleus. Furthermore, we found that the encoded protein interacts with the RPG protein required for infection thread formation. These results indicate that IEF and RPG act at the same position during the infection process.

Identification of a novel allele of the *Nodules with Activated Defense 1* gene

We found that another mutant line in our collection was impaired in the *NAD1* gene. Simultaneously, our collaborating laboratory identified another allele of this gene and the characterization of the two mutant lines was carried out together. The mutant plants showed extensive plant defense responses in the nodules. Although we failed to complement the mutant phenotype in *M. truncatula* when we tagged the NAD1 protein with the GFP fluorescent protein, we found that the NAD1 protein is localized to the endoplasmatic reticulum of N. benthamiana leave epidermal cells. Based on the functional characterization of the mutants, we concluded that the *NAD1* gene is required for the control of the defense response during the invasion of the symbiotic nodule by rhizobia.

The comparative analysis of two point mutant alleles of *Nodulation Signaling Pathways 2* (*NSP2*)

The other aspect of my dissertation is the comparative analysis of the two point mutant alleles of the already known ***N**odulation **S**ignaling **P**athways* **2** (***NSP2***) gene. One of them is a novel point mutant allele (*nsp2-6*) and the mutation affects the function of the *NSP2* gene severely. To analyze this mutant allele in more details, we compared this line with the formerly identified *nsp2-3* mutant. Both mutants carry a single amino acid substitution in the VHIID motif of the NSP2 protein. We found that the two mutant alleles show distinct root hair response to bacterial infection. Although the *nsp2-3* mutant developed aberrant infection threads, rhizobia were able to

colonize nodule cells in this mutant. The encoded NSP2 proteins of the *nsp2-3* and the novel *nsp2-6* mutants interact with NSP1 diversely and, as a consequence, the activation of early nodulin genes and induction of nodule organogenesis are distinct in the two *nsp2* alleles. The novel mutant with amino acid substitution D244H in NSP2 shows similar defects in symbiotic responses as a formerly identified *nsp2-2* mutant carrying a large deletion in the *NSP2* gene. In addition, we found that rhizobial strains induce delayed nodule formation on the roots of the *ns2-3* weak allele. Our study highlights the importance of a conserved Asp residue in the VHIID motif of NSP2 that is required for the formation of a functional NSP1-NSP2 signaling module. Furthermore, our results imply the involvement of NSP2 during differentiation of symbiotic nodule cells.

Összefoglalás

A pillangósvirágú növények képesek nitrogénkötő szimbiotikus kapcsolat kialakítására talajlakó (rhizobium) baktériumokkal. A szimbionta baktériumok a növények gyökéren kialakuló új szervben, a gyökérgümőben végzik a légköri nitrogén redukálását, melyhez a szükséges energiát és életteret a növény biztosítja. Kutatócsoportunk fő célkitűzése a folyamatot irányító növényi gének azonosítása és azok funkcionális viszgálata. Doktori dolgozatomban új szimbiotikus mutáns vonalak és ezekben a mutációt szenvedett szimbiotikus gének azonosítását és funkcionális analízisét tárgyalom. Emellett disszertációmban az *NSP2* (***N**odulation **S**ignaling **P**athways **2***) két pontmutáns alléljának összehasonlító fenotipusos és funkcionális analízisét mutatom be.

Új szimbitotikus mutáns vonalak és gének azonosítása

Munkánk során a pillangósvirágú modell növény, a *M. truncatula* egyik *Tnt1* inszerciós mutánsgyűjteményét használtuk szimbiotikus gének azonosítására hagyományos klasszikus genetikai megközelítéssel és modern molekuláris technikák alkalmazásával. Munkánk során sikerült 7 szimbiotikus mutáns vonalat azonosítanunk, melyek rhizobium baktériummal történő fertőzést követően nem voltak képesek hatékony nitrogénkötő szimbiózis kialakítására. Új-generációs szekvenálási módszerrel a 7 vonalban összesen 129 különböző inszerciós eseményt sikerült azonosítanunk. Az inszerciós események genomi pozíciójának analízise után 59 olyan jelölt gént választottunk ki, melyek nagy valószínűség szerint a vizsgált vonalakban megfigyelt mutáns fenotípust okozhatták. Az egyes vonalakban azonosított mutáns fenotípus és az inszerciós események ko-szegregációjának vizsgálatával a 7 vonal közül eddig kettőben sikerült azonosítanunk a fenotípussal ko-szegregáló inszerciós eseményt. Genetikai komplementációs kísérletekkel sikerült bizonyítanunk a két mutációt szenvedett gén szimbiotikus funkcióját.

Az *Infection-related Epidermal Factor* (*IEF*) gén azonosítása és funkcionális jellemzése

Az egyik mutánsban a szimbiotikus kapcsolat már igen korai fázisban leáll. A rhizobium fertőzést követően a gyökérszőrgörbülés a mutánsban a vad típushoz hasonlóan végbemegy, azonban infekciós fonál fejlődése elakad, és soha nem jut tovább a gyökérszőrtől a mélyebb sejtrétegek felé. Ennek következtében a mutánsban a formálódó gyökérprimordium bakteriális inváziója nem történik meg. A mutációt szenvedett gén tehát a szimbiotikus interakció során az

infekciós fonál fejlődéséhez szükséges. Kísérleteink során azonosítottuk a gént és funkciójának megerősítése céljából komplementációs kísérleteket végeztünk, melyekkel sikerült bizonyítanunk a mutációt szenvedett gén szimbiotikus funkcióját. Kimutattuk, hogy a gén a rhizobium baktériumok hatására vagy az általuk termelt NF jelmolekulák történő kezelést követően a szimbiózis nagyon korai szakaszán indukálódik az epidermisz sejtekben. Különböző, a szimbiotikus útvonal korai szakaszában hibás mutánsban vizsgáltuk a gén aktivitását és meghatároztuk a gén helyét NF szignál útvonalban. Megállapítottuk, hogy az általunk azonosított gén az NF jelátviteli útvonalon belül az *ERN1* transzkripciós faktor után helyezkedik el. Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a vizsgált gén funkciója nem szükséges a gümőfejlődés programjához, ellenben a bakteriális infekcióhoz nélkülözhetetlen. Az azonosított gén által kódolt fehérje a citoplazmában és a sejtmagban lokalizálódik. A vizsgált fehérje kölcsönhat a nitrogénkötő szimbiózis kialakításához szintén nélkülözhetetlen RPG fehérjével. Eredményeink alapján a gént ***IEF***–nek (**I**nfection-related **E**pidermal **F**actor**)** neveztük el.

A *Nodules with Activated Defense 1* (*NAD1*) gén új alléljának azonosítása és jellemzése

A másik vonalban a gén azonosítását követően kiderült, hogy a mutációt szenvedett gént a együttműködő partnerünk egy másik mutáns vonal segítségével már azonosította, így a két mutáns vonal jellemzéséből származó eredmények egy közös publikációban kerültek közlésre.
Ebben a vonalban a baktérium lefűződését követően növényi védekezési reakciók indulnak be, ezért nem alakul ki a működő gümőre jellemző nitrogénkötő zóna és gümő struktúra. Bár a GFP fehérjével fuzióban lévő NAD1 fehérje nem volt képes komplementálni a *M. truncatula* mutáns fenotípusát, megállapítottuk, hogy a NAD1 endoplazmatikus lokalizációját *N. benthamiana* levél sejtekben. A mutációt szenvedett gén vizsgálatainkkal párhuzamosan publikálásra került, ezért a mutáns vonal a *NAD1* gén új alléljának neveztük el.

A *Nodulation Signaling Pathways 2* (*NSP2*) gén két pontmutáns alléljának összehasonlító vizsgálata

Értekezésemben az új szimbiotikus gének azonosítása mellett a már ismert *NSP2* (***N**odulation **S**ignaling **P**athways **2***) gén két pontmutáns alléljának jellemzését és funkcionális analízisét tárgyalom. Mindkét pontmutáció az NSP2 fehérje GRAS doménjének VHIID motívumában található. Az *nsp2-3* mutáció az NSP2 fehérje 233. pozíciójában egy glutaminsav – lizin cserét eredményez ($NSP2_{E232K}$), míg az *nsp2-6* mutáció a VHIID motívum névadó konzervált 244. pozíciójában lévő aszparaginról történő hisztidinre történő cseréjével jár ($NSP2_{D244H}$).

Az *nsp2-6* mutáns növényen az *nsp2-2* deléciós mutánshoz hasonlóan kizárólag gyökérszőrdeformációkat figyeltünk meg, ami a nullmutáns fenotípusának tekinthető. Az *nsp2-3* mutáns gyökerein ezzel ellentétben ugyan abnormális fenotípussal, de infekciós fonalakat figyeltünk meg és a rhizobium baktériumok képesek voltak a formálódó gümőkezdemények sejtjeinek inváziójára. Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a $NSP2_{E232K}$ mutáns fehérjével ellentétben, a $NSP2_{D244H}$ forma képtelen kölcsönhatásba lépni az NSP1 fehérjével és ennek következtében a génexpresszió és a gümőorganogenezis programjának bekövetkező rendellenességet figyeltük meg ebben a mutánsban. Emellett az *nsp2-3* mutáns esetén egy törzsfüggő módon bekövetkező gümőfejlődésbeli késést is megfigyeltünk. Eredményeink rámutattak az NSP2 fehérje VHIID motívumában lévő konzervált aszparaginsav fontosságára az NSP1-NSP2 komplex formálódásában. Emellett bizonyítottuk, hogy az NSP2 transzkripciós faktor nem csak a szimbiotikus interakció korai fázisában, de később a gümősejtek differenciációjában és szerepet játszik.

Irodalomjegyzék

Ane, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E., Ayax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Denarie, J., and Cook, D.R. (2004). Medicago truncatula DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303**,** 1364-1367. doi: 10.1126/science.1092986

Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichante, J.L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R.L., and Frugier, F. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 24**,** 3838-3852. doi: 10.1105/tpc.112.103267

Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., De Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P., and Gough, C. (2006). The Medicago truncatula lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* 142**,** 265-279. doi: 10.1104/pp.106.084657

Arrighi, J.F., Godfroy, O., De Billy, F., Saurat, O., Jauneau, A., and Gough, C. (2008). The RPG gene of Medicago truncatula controls Rhizobium-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105**,** 9817-9822. doi: 10.1073/pnas.0710273105

Azarakhsh, M., Kirienko, A.N., Zhukov, V.A., Lebedeva, M.A., Dolgikh, E.A., and Lutova, L.A. (2015). KNOTTED1-LIKE HOMEOBOX 3: a new regulator of symbiotic nodule development. *J Exp Bot* 66**,** 7181-7195. doi: 10.1093/jxb/erv414

Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, F., Dattée, Y., Duc, G., Essad, S., Flament, P., Gallusci, P., Génier, G., Guy, P., Muel, X., Tourneur, J., Dénarié, J., and Huguet, T. (1990). Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of theRhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* 8**,** 40-49. doi: 10.1007/bf02668879

Barker, D. G., Pfaff, T., Moreau, D., Groves, E., Ruffel, S., Lepetit, M., Whitehand, S., Maillet, F., Nair, R. M., and Journet, E.-P. 2006. Growing M. truncatula: Choice of substrates and growth conditions. In: *Medicago truncatula* handbook.

Belfield, E.J., Gan, X., Mithani, A., Brown, C., Jiang, C., Franklin, K., Alvey, E., Wibowo, A., Jung, M., Bailey, K., Kalwani, S., Ragoussis, J., Mott, R., and Harberd, N.P. (2012). Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron

irradiation mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Genome Res* 22**,** 1306-1315. doi: 10.1101/gr.131474.111

Bennett, M.D., and Leitch, I.J. (2005). Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann Bot* 95**,** 45-90. doi: 10.1093/aob/mci003

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant Microbe Interact* 14**,** 695-700. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.695

Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218**,** 683-692. doi: 10.1007/s00425-004-1203-z

Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K.S., Wen, J., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., and Murray, J.D. (2014). The root hair "infectome" of Medicago truncatula uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for Auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell* 26**,** 4680-4701. doi: 10.1105/tpc.114.133496

Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J.T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E.B., Jensen, K.J., Roepstorff, P., Thirup, S., Ronson, C.W., Thygesen, M.B., and Stougaard, J. (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109**,** 13859-13864. doi: 10.1073/pnas.1205171109

Cao, Y., Halane, M.K., Gassmann, W., and Stacey, G. (2017). The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 68**,** 535-561. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041030

Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ane, J.M., and Oldroyd, G.E. (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108**,** 14348-14353. doi: 10.1073/pnas.1107912108

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* 8**,** 165-171. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00051-7

Catoira, R., Galera, C., De Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., and Denarie, J. (2000). Four genes of Medicago truncatula controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12**,** 1647-1666. doi: 10.1105/tpc.12.9.1647

Catoira, R., Timmers, A.C., Maillet, F., Galera, C., Penmetsa, R.V., Cook, D., Denarie, J., and Gough, C. (2001). The HCL gene of Medicago truncatula controls Rhizobium-induced root hair curling. *Development* 128**,** 1507-1518. doi:

Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.C., Niebel, A., Oldroyd, G.E., Barker, D.G., Fournier, J., and De Carvalho-Niebel, F. (2012). Medicago truncatula ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiol* 160**,** 2155-2172. doi: 10.1104/pp.112.203190

Cerri, M.R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A.B., Wang, T.L., Downie, J.A., Klingl, A., De Carvalho-Niebel, F., Xie, F., and Parniske, M. (2017). The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in Lotus japonicus. *New Phytol* 215**,** 323-337. doi: 10.1111/nph.14547

Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M. (2008). Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20**,** 3467-3479. doi: 10.1105/tpc.108.063255

Charpentier, M., Sun, J., Vaz Martins, T., Radhakrishnan, G.V., Findlay, K., Soumpourou, E., Thouin, J., Very, A.A., Sanders, D., Morris, R.J., and Oldroyd, G.E. (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 352**,** 1102-1105. doi: 10.1126/science.aae0109

Combier, J.P., De Billy, F., Gamas, P., Niebel, A., and Rivas, S. (2008). Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev* 22**,** 1549-1559. doi: 10.1101/gad.461808

Combier, J.P., Frugier, F., De Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in Medicago truncatula. *Genes Dev* 20**,** 3084-3088. doi: 10.1101/gad.402806

Couzigou, J.M., Zhukov, V., Mondy, S., Abu El Heba, G., Cosson, V., Ellis, T.H., Ambrose, M., Wen, J., Tadege, M., Tikhonovich, I., Mysore, K.S., Putterill, J., Hofer, J., Borisov, A.Y., and Ratet, P. (2012). NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE genes. *Plant Cell* 24**,** 4498-4510. doi: 10.1105/tpc.112.103747

Crdenas, L., Vidali, L., Domnguez, J., Prez, H., Snchez, F., Hepler, P.K., and Quinto, C. (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to rhizobium etli nodulation signals. *Plant Physiol* 116**,** 871-877. doi: 10.1104/pp.116.3.871

Damiani, I., Drain, A., Guichard, M., Balzergue, S., Boscari, A., Boyer, J.C., Brunaud, V., Cottaz, S., Rancurel, C., Da Rocha, M., Fizames, C., Fort, S., Gaillard, I., Maillol, V., Danchin, E.G., Rouached, H., Samain, E., Su, Y.H., Thouin, J., Touraine, B., Puppo, A., Frachisse, J.M., Pauly, N., and Sentenac, H. (2016). Nod Factor Effects on Root Hair-Specific Transcriptome of Medicago truncatula: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks. *Front Plant Sci* 7**,** 794. doi: 10.3389/fpls.2016.00794

Domonkos, A., Horvath, B., Marsh, J.F., Halasz, G., Ayaydin, F., Oldroyd, G.E., and Kalo, P. (2013). The identification of novel loci required for appropriate nodule development in Medicago truncatula. *BMC Plant Biol* 13**,** 157. doi: 10.1186/1471-2229-13-157

Domonkos, A., Kovacs, S., Gombar, A., Kiss, E., Horvath, B., Kovats, G.Z., Farkas, A., Toth, M.T., Ayaydin, F., Boka, K., Fodor, L., Ratet, P., Kereszt, A., Endre, G., and Kalo, P. (2017). NAD1 Controls Defense-Like Responses in Medicago truncatula Symbiotic Nitrogen Fixing Nodules Following Rhizobial Colonization in a BacA-Independent Manner. *Genes (Basel)* 8. doi: 10.3390/genes8120387

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417**,** 962-966. doi: 10.1038/nature00842

Etzler, M.E., Kalsi, G., Ewing, N.N., Roberts, N.J., Day, R.B., and Murphy, J.B. (1999). A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96**,** 5856-5861. doi: 10.1073/pnas.96.10.5856

Feher, A., and Lajko, D.B. (2015). Signals fly when kinases meet Rho-of-plants (ROP) small G-proteins. *Plant Sci* 237**,** 93-107. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.05.007

Floss, D.S., Levy, J.G., Levesque-Tremblay, V., Pumplin, N., and Harrison, M.J. (2013). DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110**,** E5025-5034. doi: 10.1073/pnas.1308973110

Fonouni-Farde, C., Kisiala, A., Brault, M., Emery, R.J.N., Diet, A., and Frugier, F. (2017). DELLA1-Mediated Gibberellin Signaling Regulates Cytokinin-Dependent Symbiotic Nodulation. *Plant Physiol* 175**,** 1795-1806. doi: 10.1104/pp.17.00919

Fonouni-Farde, C., Tan, S., Baudin, M., Brault, M., Wen, J., Mysore, K.S., Niebel, A., Frugier, F., and Diet, A. (2016). DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nat Commun* 7**,** 12636. doi: 10.1038/ncomms12636

Fournier, J., Timmers, A.C., Sieberer, B.J., Jauneau, A., Chabaud, M., and Barker, D.G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of Medicago truncatula and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol* 148**,** 1985-1995. doi: 10.1104/pp.108.125674

Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68**,** 280-+. doi: 10.1128/Mmbr.68.2.280-300.2004

Galloway, J.N.D.F.J.C.D.G.B.E.W.H.R.W.S.S.P.a.G.P. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70**,** 153–226. doi:

Garcia, J., Barker, D.G., and Journet, E.P. (2006). *Seed storage and germination. Medicago truncatula handbook.*

Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B.W., and Oldroyd, G.E. (2006a). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441**,** 1149-1152. doi: 10.1038/nature04812

Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T.B., Munoz, A., Poovaiah, B.W., and Oldroyd, G.E.D. (2006b). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* 441**,** 1149-1152. doi: 10.1038/nature04812

Gonzalez-Rizzo, S.C., M.; Frugier, F. (2006). The Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti. *Plant Cell* 18**,** 2680-2693. doi: 10.1105/tpc.106.043778

Gorlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* 17**,** 2721-2727. doi: 10.1093/emboj/17.10.2721

Grandbastien, M.a.S., A.; Caboche, M. (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337**,** 376-380. doi: 10.1038/337376a0

Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Draxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., and Parniske, M. (2010). NENA, a Lotus japonicus homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22**,** 2509-2526. doi: 10.1105/tpc.109.069807

Hakoshima, T. (2018). Structural basis of the specific interactions of GRAS family proteins. *FEBS Lett* 592**,** 489-501. doi: 10.1002/1873-3468.12987

Handberg, K.S.J. (1992). Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal* 2(4)**,** 487-496 doi:

Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H. (2010). A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* 63**,** 141-154. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04228.x

Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293**,** 1129-1133. doi: 10.1126/science.1061457

Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A. (2006). Lotus japonicus nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiol* 142**,** 1739-1750. doi: 10.1104/pp.106.089508

Hirsch, S., Kim, J., Munoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in Medicago truncatula. *Plant Cell* 21**,** 545-557. doi: 10.1105/tpc.108.064501

Horvath, B., Yeun, L.H., Domonkos, A., Halasz, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miro, K., Hirsch, S., Sun, J.H., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Ane, J.M., Oldroyd, G.E.D., and Kalo, P. (2011). Medicago truncatula IPD3 Is a Member of the Common Symbiotic Signaling Pathway Required for Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24**,** 1345-1358. doi: 10.1094/Mpmi-01-11-0015

Hossain, M.S., Liao, J., James, E.K., Sato, S., Tabata, S., Jurkiewicz, A., Madsen, L.H., Stougaard, J., Ross, L., and Szczyglowski, K. (2012). Lotus japonicus ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiol* 160**,** 917-928. doi: 10.1104/pp.112.202572

Iantcheva, A., Chabaud, M., Cosson, V., Barascud, M., Schutz, B., Primard-Brisset, C., Durand, P., Barker, D.G., Vlahova, M., and Ratet, P. (2009). Osmotic shock improves Tnt1 transposition frequency in Medicago truncatula cv Jemalong during in vitro regeneration. *Plant Cell Rep* 28**,** 1563-1572. doi: 10.1007/s00299-009-0755-6

Jayaraman, D., Richards, A.L., Westphall, M.S., Coon, J.J., and Ane, J.M. (2017). Identification of the phosphorylation targets of symbiotic receptor-like kinases using a high-throughput multiplexed assay for kinase specificity. *Plant J* 90**,** 1196-1207. doi: 10.1111/tpj.13529

Jin, Y., Chen, Z., Yang, J., Mysore, K.S., Wen, J., Huang, J., Yu, N., and Wang, E. (2018). IPD3 and IPD3L Function Redundantly in Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Front Plant Sci* 9**,** 267. doi: 10.3389/fpls.2018.00267

Jin, Y., Liu, H., Luo, D., Yu, N., Dong, W., Wang, C., Zhang, X., Dai, H., Yang, J., and Wang, E. (2016). DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways. *Nat Commun* 7**,** 12433. doi: 10.1038/ncomms12433

Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308**,** 1786-1789. doi: 10.1126/science.1110951

Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca2+ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103**,** 359-364. doi: 10.1073/pnas.0508883103

Kang, H., Chu, X., Wang, C., Xiao, A., Zhu, H., Yuan, S., Yang, Z., Ke, D., Xiao, S., Hong, Z., and Zhang, Z. (2014). A MYB coiled-coil transcription factor interacts with NSP2 and is involved in nodulation in Lotus japonicus. *New Phytol* 201**,** 837-849. doi: 10.1111/nph.12593

Kang, Y., Li, M., Sinharoy, S., and Verdier, J. (2016). A Snapshot of Functional Genetic Studies in Medicago truncatula. *Front Plant Sci* 7**,** 1175. doi: 10.3389/fpls.2016.01175

Kawaharada, Y., James, E.K., Kelly, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2017a). The Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation 1 (ERN1) Transcription Factor Is Required for Infection-Thread Formation in Lotus japonicus. *Mol Plant Microbe Interact* 30**,** 194-204. doi: 10.1094/MPMI-11-16-0237-R

Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszynski, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., Vinther, M., Andersen, S.U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K.J., Ronson, C.W., Blaise, M., Radutoiu, S., and Stougaard, J. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523**,** 308-+. doi: 10.1038/nature14611

Kawaharada, Y., Nielsen, M.W., Kelly, S., James, E.K., Andersen, K.R., Rasmussen, S.R., Fuchtbauer, W., Madsen, L.H., Heckmann, A.B., Radutoiu, S., and Stougaard, J. (2017b). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nat Commun* 8**,** 14534. doi: 10.1038/ncomms14534

Kazmierczak, T., Nagymihaly, M., Lamouche, F., Barriere, Q., Guefrachi, I., Alunni, B., Ouadghiri, M., Ibijbijen, J., Kondorosi, E., Mergaert, P., and Gruber, V. (2017). Specific Host-Responsive Associations Between Medicago truncatula Accessions and Sinorhizobium Strains. *Mol Plant Microbe Interact* 30**,** 399-409. doi: 10.1094/MPMI-01-17-0009-R

Ke, D., Fang, Q., Chen, C., Zhu, H., Chen, T., Chang, X., Yuan, S., Kang, H., Ma, L., Hong, Z., and Zhang, Z. (2012). The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in Lotus japonicus. *Plant Physiol* 159**,** 131-143. doi: 10.1104/pp.112.197269

Kevei, Z., Lougnon, G., Mergaert, P., Horvath, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B., Kondorosi, A., Endre, G., Kondorosi, E., and Ane, J.M. (2007). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NORK and is crucial for nodulation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 19**,** 3974-3989. doi: 10.1105/tpc.107.053975

Kiss, E., Olah, B., Kalo, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbola, A., Lozsa, A., Kontar, K., Middleton, P., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Endre, G. (2009). LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol* 151**,** 1239-1249. doi: 10.1104/pp.109.143933

Kistner, C., and Parniske, M. (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci* 7**,** 511-518. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02356-7

Kontra-Kováts, G.Z., Fodor, L., Horváth, B., Domonkos, A., Iski, G., Chen, Y., Chen, R., and Kaló, P. (2019). "Isolation and characterization of non-transposon symbiotic nitrogen fixing mutants of Medicago truncatula. The Model Legume Medicago truncatula.").

Kovacs, S., Kiss, E., Jenei, S., Feher-Juhasz, E., Kereszt, A., and Endre, G. (2022). The Medicago truncatula IEF gene is crucial for the progression of bacterial infection during symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*. doi: 10.1094/MPMI-11-21-0279-R

Kovacs, S., Fodor, L., Domonkos, A., Ayaydin, F., Laczi, K., Rakhely, G., and Kalo, P. (2021). Amino Acid Polymorphisms in the VHIID Conserved Motif of Nodulation Signaling Pathways 2 Distinctly Modulate Symbiotic Signaling and Nodule Morphogenesis in Medicago truncatula. *Front Plant Sci* 12**,** 709857. doi: 10.3389/fpls.2021.709857

Laffont, C., Huault, E., Gautrat, P., Endre, G., Kalo, P., Bourion, V., Duc, G., and Frugier, F. (2019). Independent Regulation of Symbiotic Nodulation by the SUNN Negative and CRA2 Positive Systemic Pathways. *Plant Physiol* 180**,** 559-570. doi: 10.1104/pp.18.01588

Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., De Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J* 79**,** 757-768. doi: 10.1111/tpj.12587

Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., Mun, J.H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., and Niebel, A. (2014). The CCAAT box-binding

transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* 65**,** 481-494. doi: 10.1093/jxb/ert392

Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A., Carlson, R.W., and Kijne, J.W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from Rhizobium leguminosarum binds host plant lectin. *Mol Microbiol* 59**,** 1704-1713. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x

Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Herve, C., Toth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L., Murray, J.D., Udvardi, M.K., Raffaele, S., Mongrand, S., Cullimore, J., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107**,** 2343-2348. doi: 10.1073/pnas.0913320107

Lei, M.J., Wang, Q., Li, X., Chen, A., Luo, L., Xie, Y., Li, G., Luo, D., Mysore, K.S., Wen, J., Xie, Z.P., Staehelin, C., and Wang, Y.Z. (2015). The small GTPase ROP10 of Medicago truncatula is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation. *Plant Cell* 27**,** 806-822. doi: 10.1105/tpc.114.135210

Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C., and Debelle, F. (2004). A putative Ca2+ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303**,** 1361-1364. doi: 10.1126/science.1093038

Li, S., Zhao, Y., Zhao, Z., Wu, X., Sun, L., Liu, Q., and Wu, Y. (2016). Crystal Structure of the GRAS Domain of SCARECROW-LIKE7 in Oryza sativa. *Plant Cell* 28**,** 1025-1034. doi: 10.1105/tpc.16.00018

Limpens, E., and Bisseling, T. (2014). CYCLOPS: a new vision on rhizobium-induced nodule organogenesis. *Cell Host Microbe* 15**,** 127-129. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.015

Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., and Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302**,** 630-633. doi: 10.1126/science.1090074

Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). Formation of organelle-like N2-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102**,** 10375-10380. doi: 10.1073/pnas.0504284102

Lin, J.S., Li, X., Luo, Z., Mysore, K.S., Wen, J., and Xie, F. (2018). NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in Medicago truncatula. *Nat Plants* 4**,** 942-952. doi: 10.1038/s41477-018-0261-3

Liu, C.W.B., A.; Guan, D.; Cerri, M. R.; Jackson, K.; Jiang, S. Y.; Robson, F.; Radhakrishnan, G. V.; Roy, S.; Bone, C.; Stacey, N.; Rogers, C.; Trick, M.; Niebel, A.; Oldroyd, G. E.;

De Carvalho-Niebel, F.; Murray, J. D. (2019a). NIN Acts as a Network Hub Controlling a Growth Module Required for Rhizobial Infection. *Plant Physiology* 179**,** 1704-1722. doi: 10.1104/pp.18.01572

Liu, J., Deng, J., Zhu, F., Li, Y., Lu, Z., Qin, P., Wang, T., and Dong, J. (2018). The MtDMI2-MtPUB2 Negative Feedback Loop Plays a Role in Nodulation Homeostasis. *Plant Physiol* 176**,** 3003-3026. doi: 10.1104/pp.17.01587

Liu, J., Rutten, L., Limpens, E., Van Der Molen, T., Van Velzen, R., Chen, R., Chen, Y., Geurts, R., Kohlen, W., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2019). A Remote cis-Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 31**,** 68-83. doi: 10.1105/tpc.18.00478

Liu, J.Y., Rasing, M., Zeng, T., Klein, J., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2021). NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in Medicago truncatula nodules. *New Phytologist* 230**,** 290-303. doi: 10.1111/nph.17215

Liu, J.Y.R., L.; Limpens, E.; Van Der Molen, T.; Van Velzen, R.; Chen, R. J.; Chen, Y. H.; Geurts, R.; Kohlen, W.; Kulikova, O.; Bisseling, T. (2019b). A Remote cis-Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 31**,** 68-83. doi: 10.1105/tpc.18.00478

Long, S.R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8**,** 1885-1898. doi: 10.1105/tpc.8.10.1885

Lupas, A.N., and Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* 70**,** 37-+. doi: 10.1016/S0065-3233(04)70003-0

Maillet, F., Fournier, J., Mendis, H.C., Tadege, M., Wen, J., Ratet, P., Mysore, K.S., Gough, C., and Jones, K.M. (2020). Sinorhizobium meliloti succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the Medicago truncatula LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection. *Plant J* 102**,** 311-326. doi: 10.1111/tpj.14625

Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E. (2007). Medicago truncatula NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 144**,** 324-335. doi: 10.1104/pp.106.093021

Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., Vandenbosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., and Oldroyd, G.E. (2007). An ERF transcription factor in Medicago

truncatula that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* 19**,** 1221-1234. doi: 10.1105/tpc.106.048264

Mier, P., Alanis-Lobato, G., and Andrade-Navarro, M.A. (2017). Protein-protein interactions can be predicted using coiled coil co-evolution patterns. *Journal of Theoretical Biology* 412**,** 198-203. doi: 10.1016/j.jtbi.2016.11.001

Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D. (2010). Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component During Infection Thread and Root Hair Growth in Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23**,** 1553-1562. doi: 10.1094/Mpmi-06-10-0144

Moreau, D. (2006). Morphology, development and plant architecture of M. truncatula. *Medicago Hand Book*. doi:

Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315**,** 101-104. doi: 10.1126/science.1132514

Murray, J.D., Muni, R.R.D., Torres-Jerez, I., Tang, Y.H., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G.M., Laxmi, A., Cheng, X.F., Wen, J.Q., Vaughan, D., Schultze, M., Sun, J., Charpentier, M., Oldroyd, G., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Chen, R.J., and Udvardi, M.K. (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of Medicago truncatula. *Plant Journal* 65**,** 244-252. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04415.x

Oldroyd, G. (2007). Root-nodule Symbiosis: Molecular Basis of Nodule Formation. doi: 10.1002/9780470015902.a0020128

Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5**,** 566-576. doi: 10.1038/nrm1424

Oldroyd, G.E., and Long, S.R. (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of Medicago truncatula involved in Nod actor signaling. *Plant Physiol* 131**,** 1027-1032. doi: 10.1104/pp.102.010710

Ovchinnikova, E., Journet, E.P., Chabaud, M., Cosson, V., Ratet, P., Duc, G., Fedorova, E., Liu, W., Den Camp, R.O., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Borisov, A., Bisseling, T., and Limpens, E. (2011). IPD3 controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and Medicago Spp. *Mol Plant Microbe Interact* 24**,** 1333-1344. doi: 10.1094/MPMI-01-11-0013

Pislariu, C.I., Murray, J.D., Wen, J., Cosson, V., Muni, R.R., Wang, M., Benedito, V.A., Andriankaja, A., Cheng, X., Jerez, I.T., Mondy, S., Zhang, S., Taylor, M.E., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Chen, R., and Udvardi, M.K. (2012). A Medicago truncatula

tobacco retrotransposon insertion mutant collection with defects in nodule development and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol* 159**,** 1686-1699. doi: 10.1104/pp.112.197061

Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., and Frugier, F. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in Medicago truncatula. *Plant J* 65**,** 622-633. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x

Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18**,** 111-119. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00431.x

Qiu, L., Lin, J.S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T.L., Downie, J.A., and Xie, F. (2015). SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genet* 11**,** e1005623. doi: 10.1371/journal.pgen.1005623

Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425**,** 585-592. doi: 10.1038/nature02039

Rakocevic, A., Mondy, S., Tirichine, L., Cosson, V., Brocard, L., Iantcheva, A., Cayrel, A., Devier, B., Abu El-Heba, G.A., and Ratet, P. (2009). MERE1, a low-copy-number copia-type retroelement in Medicago truncatula active during tissue culture. *Plant Physiol* 151**,** 1250-1263. doi: 10.1104/pp.109.138024

Reed, S.C.C., C. C.; Townsend, A. R. (2011). Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42**,** 489–512. doi:

Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91**,** 11841-11843. doi: 10.1073/pnas.91.25.11841

Ried, M.K., Antolin-Llovera, M., and Parniske, M. (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *Elife* 3. doi: 10.7554/eLife.03891

Rival, P., De Billy, F., Bono, J.J., Gough, C., Rosenberg, C., and Bensmihen, S. (2012). Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in Medicago truncatula. *Development* 139**,** 3383-3391. doi: 10.1242/dev.081620

Roberts, N.J., Morieri, G., Kalsi, G., Rose, A., Stiller, J., Edwards, A., Xie, F., Gresshoff, P.M., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., and Etzler, M.E. (2013). Rhizobial and mycorrhizal

symbioses in Lotus japonicus require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiol* 161**,** 556-567. doi: 10.1104/pp.112.206110

Rogers, C.O., G. E. D. (2008). Fast neutron mutagenesis for functional genomics. *The Handbook of Plant Functional Genomics* Wiley-VCH, Weinheim, Germany**,** 291–306. doi:

Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrere, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., De Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., and Gamas, P. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* 77**,** 817-837. doi: 10.1111/tpj.12442

Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., Pislariu, C.I., Frugoli, J., Dickstein, R., and Udvardi, M.K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 32**,** 15-41. doi: 10.1105/tpc.19.00279

Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., and Kawaguchi, M. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in Lotus japonicus. *Plant Cell* 19**,** 610-624. doi: 10.1105/tpc.106.046938

Sanger, F.N., S.; Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74**,** 5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463

Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402**,** 191-195. doi: 10.1038/46058

Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo Journal* 21**,** 3070-3080. doi: DOI 10.1093/emboj/cdf312

Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M. (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 15**,** 139-152. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.011

Sinharoy, S., Liu, C., Breakspear, A., Guan, D., Shailes, S., Nakashima, J., Zhang, S., Wen, J., Torres-Jerez, I., Oldroyd, G., Murray, J.D., and Udvardi, M.K. (2016). A Medicago truncatula Cystathionine-beta-Synthase-like Domain-Containing Protein Is Required for Rhizobial Infection and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Physiol* 170**,** 2204-2217. doi: 10.1104/pp.15.01853

Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308**,** 1789-1791. doi: 10.1126/science.1111025

Soltis, P.S.S., D. E.; Chase, M. W. (1999). Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* 402**,** 402-404. doi: 10.1038/46528

Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., and Kawaguchi, M. (2014). Nodule Inception creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111**,** 14607-14612. doi: 10.1073/pnas.1412716111

Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M. (2013). Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in Lotus japonicus. *PLoS Genet* 9**,** e1003352. doi: 10.1371/journal.pgen.1003352

Starker, C.G., Parra-Colmenares, A.L., Smith, L., Mitra, R.M., and Long, S.R. (2006). Nitrogen fixation mutants of Medicago truncatula fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Physiol* 140**,** 671-680. doi: 10.1104/pp.105.072132

Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417**,** 959-962. doi: 10.1038/nature00841

Tadege, M., Wang, T.L., Wen, J., Ratet, P., and Mysore, K.S. (2009). Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology. *Plant Physiol* 151**,** 978-984. doi: 10.1104/pp.109.144097

Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P., and Mysore, K.S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume Medicago truncatula. *Plant J* 54**,** 335-347. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03418.x

Terpolilli, J.J., O'hara, G.W., Tiwari, R.P., Dilworth, M.J., and Howieson, J.G. (2008). The model legume Medicago truncatula A17 is poorly matched for N2 fixation with the sequenced microsymbiont Sinorhizobium meliloti 1021. *New Phytol* 179**,** 62-66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02464.x

Timmers, A.C.A., M. C.; truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126**,** 3617-3628. doi:

Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrektsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor

triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315**,** 104-107. doi: 10.1126/science.1132397

Toth, K., Stratil, T.F., Madsen, E.B., Ye, J., Popp, C., Antolin-Llovera, M., Grossmann, C., Jensen, O.N., Schussler, A., Parniske, M., and Ott, T. (2012). Functional domain analysis of the Remorin protein LjSYMREM1 in Lotus japonicus. *PLoS One* 7**,** e30817. doi: 10.1371/journal.pone.0030817

Truebestein, L., and Leonard, T.A. (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays* 38**,** 903-916. doi: 10.1002/bies.201600062

Van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.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**,** 70-72. doi: 10.1126/science.257.5066.70

Van Rhijn, P., Fujishige, N.A., Lim, P.O., and Hirsch, A.M. (2001). Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by Rhizobium leguminosarum biovar viciae. *Plant Physiol* 126**,** 133-144. doi: 10.1104/pp.126.1.133

Veereshlingam, H., Haynes, J.G., Penmetsa, R.V., Cook, D.R., Sherrier, D.J., and Dickstein, R. (2004). nip, a symbiotic Medicago truncatula mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. *Plant Physiol* 136**,** 3692-3702. doi: 10.1104/pp.104.049064

Vernie, T., Camut, S., Camps, C., Rembliere, C., De Carvalho-Niebel, F., Mbengue, M., Timmers, T., Gasciolli, V., Thompson, R., Le Signor, C., Lefebvre, B., Cullimore, J., and Herve, C. (2016). PUB1 Interacts with the Receptor Kinase DMI2 and Negatively Regulates Rhizobial and Arbuscular Mycorrhizal Symbioses through Its Ubiquitination Activity in Medicago truncatula. *Plant Physiol* 170**,** 2312-2324. doi: 10.1104/pp.15.01694

Vernie, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M.L., De Carvalho-Niebel, F., and Oldroyd, G.E. (2015). The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the Medicago truncatula Root. *Plant Cell* 27**,** 3410-3424. doi: 10.1105/tpc.15.00461

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33**,** 949-956. doi: DOI 10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x

Wang, C., Yu, H., Luo, L., Duan, L., Cai, L., He, X., Wen, J., Mysore, K.S., Li, G., Xiao, A., Duanmu, D., Cao, Y., Hong, Z., and Zhang, Z. (2016). NODULES WITH ACTIVATED

DEFENSE 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in Medicago truncatula. *New Phytol* 212**,** 176-191. doi: 10.1111/nph.14017

Wang, D., Yang, S., Tang, F., and Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14**,** 334-342. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x

Xiao, A.F., Yu, H.X., Fan, Y.Q., Kang, H., Ren, Y.P., Huang, X.Q., Gao, X.M., Wang, C., Zhang, Z.M., Zhu, H., and Cao, Y.R. (2020). Transcriptional regulation of NIN expression by IPN2 is required for root nodule symbiosis in Lotus japonicus. *New Phytologist* 227**,** 513-528. doi: 10.1111/nph.16553

Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T. (2014). Fate map of Medicago truncatula root nodules. *Development* 141**,** 3517-3528. doi: 10.1242/dev.110775

Xie, F., Murray, J.D., Kim, J., Heckmann, A.B., Edwards, A., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109**,** 633-638. doi: 10.1073/pnas.1113992109

Yang, Y.L., R.; qi, M. (2000). In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J* 22**,** 543-551. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00760.x

Yano, K., Shibata, S., Chen, W.L., Sato, S., Kaneko, T., Jurkiewicz, A., Sandal, N., Banba, M., Imaizumi-Anraku, H., Kojima, T., Ohtomo, R., Szczyglowski, K., Stougaard, J., Tabata, S., Hayashi, M., Kouchi, H., and Umehara, Y. (2009). CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 60**,** 168-180. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03943.x

Yano, K., Yoshida, S., Muller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., and Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105**,** 20540-20545. doi: 10.1073/pnas.0806858105

Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L.H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M.S., Szczyglowski, K., Morieri, G., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., Nielsen, M.W., Rusek, A.M., Sato, S., Tabata, S., James, E.K., Oyaizu, H., Sandal, N., and Stougaard, J. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of Lotus japonicus roots by Mesorhizobium loti. *Plant Cell* 21**,** 267-284. doi: 10.1105/tpc.108.063693

Zhu, H., Chen, T., Zhu, M., Fang, Q., Kang, H., Hong, Z., and Zhang, Z. (2008). A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule

development in Lotus japonicus. *Plant Physiol* 148**,** 337-347. doi: 10.1104/pp.108.119164