

Szimbiotikus peptidek szerepe a nitrogénkötő gümők fejlődésében

PhD értekezés

Pál Alexandra

Témavezetők:

Dr. Endre Gabriella

Dr. Lima Rui Dániel

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológia Intézet

2025

Szeged

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	6
1.1 A nitrogén kulcsfontosságú szerepe az élővilágban	6
1.2 Az ipari nitrogénkötés jelentősége és problémái	6
1.2.1 A Haber–Bosch eljárás hatása az élelmiszertermelésre	6
1.2.2 A folyamat energiaigénye és környezeti következményei	7
1.2.3 Zöldtrágyázás mezőgazdasági gyakorlata	8
1.3 A biológiai nitrogénkötés természetes folyamata	9
1.3.1 Nitrogénkötő mikroorganizmusok és szerepük az ökológiai körforgásban	9
1.3.2 A nitrogenáz enzimkomplex szerepe a diazotróf mikroorganizmusokban	10
1.3.3 A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának evolúciója	12
1.4 A <i>Medicago truncatula</i> , mint kutatási modellnövény	12
1.5 A szimbiózis kialakulásának molekuláris háttere	13
1.5.1 A Nod faktorok szerepe a növény-baktérium kommunikációban és gümőfejlődésben	13
1.5.2 A növényi és baktérium jelátviteli utak koordinációja	14
1.6 A gümők fejlődése és morfológiai típusai	15
1.7 Endoreduplikáció a gümőfejlődés során	17
1.8 A Bakteroid differenciáció és szabályozás	18
1.9 Gümőspecifikus peptidek típusai és szerepük a nitrogénkötő szimbiózisban	19
1.9.1 NCR peptidek: szerkezeti és funkcionális jellemzők	20
1.9.2 Glicinben gazdag fehérjék (GRP-k) a növényekben	23
1.9.3 A <i>nodGRP</i> gének első jellemzése <i>M. sativa</i> fajban	24
1.9.4 A <i>nodGRP</i> és NCR gének közös jellemzője a gümőspecifikus expresszió	26
1.9.5 A <i>M. truncatula nodGRP</i> gének szekvenciális expressziója és a <i>nodGRP3C</i> gén kiválasztása	27
1.9.6 Gümőspecifikus glicin-gazdag fehérjék (<i>nodGRP</i>) szerkezete	29
1.10 A gümő szenescenciája: az öregedési folyamat molekuláris szabályozása	30
2. CÉLKITŰZÉSEK	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
3.1 Klónozás / Vektorok létrehozása	34
3.2 Növényi anyag és növekedési körülmények	34
3.2.1 A magok csíráztatása	34
3.2.2 A növények nevelése	35
3.3 Bakteriális törzsek és inokuláció	35
3.4 Stabil transzformáns növények előállítása	35

3.5 Mikroszkópos vizsgálatok	36
3.5.1 EdU-jelölés (S-fázis detektálása)	38
3.5.2 Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	38
3.5.3 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)	39
3.6 Génexpressziós analízis (RT-qPCR)	39
3.7 Transzkriptomikai elemzés	40
3.8 Áramlási citometria (Flow cytometry)	40
3.9 Fehérjekivonás és Western blot	41
3.10 Felhasznált programok	41
3.11 Adatkiértékelés és statisztika	42
4. EREDMÉNYEK	43
4.1 A gümők növekedésének és a <i>nifH</i> promóter:: <i>GUS</i> aktivitásának változásai a <i>dnf4</i> , <i>dnf7-2</i> , TR183, TR36 és TRV36 mutánsokban	43
4.2 A differenciálódott bakteroidok fokozatos eltűnése a <i>Fix⁻ M. truncatula</i> mutánsokban	45
4.3 A gyorsan előrehaladó gümőszeszencenciát zárt endodermisz kíséri	48
4.4 A magas ploidiaszámú sejtmagok arányának csökkenése <i>Fix⁻</i> mutáns gümőkben	52
4.5 A leghemoglobin expressziója károsodik a <i>Fix⁻</i> mutánsokban	55
4.6 Szeszencia-markergének korai aktiválódása a védekezési gének bekapcsolódása nélkül a <i>Fix⁻</i> mutáns gümőkben	56
4.7 Antiszensz <i>nodGRP3C</i> konstrukció hatása a szimbiotikus gümőfejlődésre	59
4.7.1 A <i>nodGRP3C</i> gén csendesítésének hatása a <i>M. truncatula</i> növények növekedésére és gyökérgümőinek fejlődésére	60
4.7.2 Mikroszkópos eredmények a <i>nodGRP3C</i> AS vonal növényeinek gümőiről	61
4.8 A <i>nodGRP3C</i> ektopikus túltermelésének bizonyítása real-time PCR reakcióval és a túltermelés hatásai a gümőképződésre	64
4.8.1 Mikroszkópos megfigyelések a <i>nodGRP3C</i> ektopikus overexpressziója esetén	66
4.8.2 Ultrastrukturális változások a <i>nodGRP3C</i> ektopikus túltermelésével létrejött <i>M. truncatula</i> gümőkben	67
4.9 Transzkriptomikai eredmények	69
5. MEGBESZÉLÉS	72
5.1 Különböző kiváltó tényezők, közös következmény a <i>Fix⁻ M. truncatula</i> gümőkben	72
5.2 Eredmények megvitatása a <i>nodGRP3C</i> funkcióról	74
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	76
IRODALOMJEGYZÉK	77
ÖSSZEFOGLALÁS	87
SUMMARY	91
FÜGGELÉKEK	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMP	antimikrobiális peptid (antimicrobial peptide)
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AS	antiszensz (antiszensz, géncsendesítés)
as	aminosavak (amino acids)
A17	<i>Medicago truncatula</i> Jemalong A17 (vad típus)
BacA	bakteriális ABC-transzporter, szimbiotikus szerepe az NCR-ek felvétele a sejtbe
BASTA	foszfinotricin (phosphinothricin, PPT)
BNF	biológiai nitrogénkötés (biological nitrogen-fixation)
BNM	buffered nod medium: alacsony nitrogéntartalmú növényi táp
bp	bázispár (basepair)
CAML	kalmodulin-szerű fehérjék (calmodulin-like proteins)
cDNS	komplementer DNS (complementary DNA, cDNA)
cds	kódoló DNS-szekvencia (coding DNA sequence)
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
<i>dnf1</i>	defective in nitrogen-fixation 1, nitrogénkötésre képtelen-mutáns 1
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid, DNA)
dpi	a fertőzés után eltelt idő, napokban megadva (days post inoculation)
dsDNS	kettősszálú DNS (double stranded DNA)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
EdU	5-etinil-2'-dezoxiuridin
EPS	exopoliszacharid
ER	endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)
GFP	green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje
GUS	beta glucuronidase protein, béta-glükuronidáz enzim
GRP	glicinben gazdag fehérje (glycine-rich protein)
IF	infekciós fonál (infection thread, IT)
IR	inverted repeat, inverz ismétlődés
IRLC	inverted repeat-lacking clade, fordított ismétlődést nélkülöző klád
J5	<i>Medicago truncatula</i> Jemalong J5 (vad típus)

KPS	kapszuláris poliszacharid
IZ	átmeneti zóna, interzóna (Zone II-III, interzone): a gümő átalakulási zónája
Lb	leghemoglobin
LB	Luria-Bertani medium
Lj	<i>Lotus japonicus</i> , <i>L. corniculatus subsp. japonicus</i> , szarvaskerep (Robinioid)
LjUBQ10	<i>Lotus japonicus</i> ubiquitin 10
LPS	lipopoliszacharid
MBC	minimális baktericid koncentráció (minimal bactericidal concentration)
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA, mRNA)
Ms	<i>Medicago sativa</i> , takarmánylucerna
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
NC	nettó töltés (net charge)
NCBI	National Center for Biotechnology Information database
NCR	gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptid (nodule-specific cysteine-rich peptide): az IRLC növényekben fejeződnek ki
NCRL	NCR-szerű (NCR-like): a Dalbergioid növényekben fejeződnek ki
nod	nodulation, gümőképződés
nodGRP	gümőspecifikus glicinben gazdag fehérje (nodule-specific glycine-rich protein)
Nod faktor	nodulation factor, gümőképződési faktor
NodD	nodulation protein D, gümőképződési fehérje D
OE	overexpression (túltermelés)
ON	overnight, egy éjszakán át
OD	optikai denzitás
p35S	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV) 35S promóter
PBM	peribakteroid membrán (peribacteroid membrane)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCD	programozott sejthalál (programmed cell death)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
pI	izoelektromos pont (isoelectric point)
PI	propídium-jodid
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride)
PPT	foszfinotricin (phosphinothricin), BASTA
R gén	rezisztencia gén
Rm41	<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm41 rhizobium törzs (vad típus)

RNAi	RNA interference (RNS-interferencia, géncsendesítés)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid, RNA)
ROS	reaktív oxigénfajok (reactive oxygen species)
rpm	percenkénti fordulatszám
RT-qPCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time PCR)
R108	<i>Medicago truncatula</i> R108 ökotípus (vad típus)
SEM	pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope)
Sm1021	<i>Sinorhizobium meliloti</i> Sm1021 rhizobium törzs (vad típus)
SNARP	small nodule-acidic-rich peptides, kis méretű, gümőspecifikus savas peptidek
SP	szignál peptid (signal peptide)
SYTO 9	SYTO 9 fluoreszcens festék
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> mikroorganizmusból izolált DNS polimeráz
TF	transzkripció faktor (transcription factor)
TM	transzmembrán (transmembrane)
UTR	nem transzlálódó régió (untranslated region)
WSM419	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 rhizobium törzs (vad típus)
ZI	egykes zóna (Zone I, meristematic zone): a gümő merisztematikus zónája
ZII	kettes zóna (Zone II, infection zone): a gümő infekciós zónája
ZII _d	kettes zóna disztális része (Zone II, distal): a ZII gümőcsúcs felé eső része
ZII _p	kettes zóna proximális része (Zone II, proxymal): a ZII gyökér felé eső része
ZIII	hármask zóna (Zone III, nitrogen-fixing zone): a gümő nitrogénkötő zónája
ZIV	négykes zóna (Zone IV, senescence zone): öregedési zóna

1. BEVEZETÉS

1.1 A nitrogén kulcsfontosságú szerepe az élővilágban

A nitrogén az élet esszenciális eleme, mivel nélkülözhetetlen az aminosavak, fehérjék, nukleinsavak és más biológiailag fontos makromolekulák szintéziséhez. Az állatok – köztük az ember – nitrogénszükségletüket a táplálék fehérjéiből nyerik, amelyek lehetnek növényi vagy állati eredetűek. E fehérjék nitrogénje nagyrészt (95%-ban) abból a korlátozottan rendelkezésre álló, biológiailag fixált nitrogénkészletből származik, amelyet nitrogénkötő mikroorganizmusok és a műtrágyázás biztosít a növények számára. Amennyiben nem áll rendelkezésre elég nitrogén a növények fejlődése jelentősen visszamarad, és ezáltal csökken a biomassza-termelésük.

A nitrogén áramlása az ökoszisztémákban nagyon komplex folyamat, amely magában foglalja a légköri, szárazföldi és vízi ökoszisztémák közötti áramlást. A természetes nitrogénkörforgás kulcslépései a biológiai nitrogénkötés, nitrifikáció és denitrifikáció (Galloway és mtsai., 2004). Az emberi tevékenységek jelentősen megzavarták, és a mai napig megbontják ezt az egyensúlyt. Műtrágyagyártás céljából az ipari nitrogénkötés drasztikusan növelte a biológiailag hozzáférhető nitrogén mennyiségét (Erisman és mtsai., 2008), de a folyamathoz szükséges fosszilis tüzelőanyagok égetése reaktív nitrogént juttat a környezetbe (Fowler és mtsai., 2013). Így a műtrágyagyártás és felhasználás is súlyos környezeti következményekkel jár: eutrofizáció a vízi ökoszisztémákban, talajsavasodás, biodiverzitás-csökkenés a szárazföldön, valamint fokozott üvegházhatás a légkörben (Vitousek és mtsai., 1997). A nitrogénműtrágyák világszintű felhasználása az 1960-as években még kevesebb mint 20 millió tonna volt, míg napjainkban a 100–120 millió tonnát is eléri. Ez a nagymértékű növekedés megmutatja, milyen mértékben támaszkodik a modern mezőgazdaság az ipari nitrogénforrásokra. A fenntartható ökoszisztéma-működtetés szempontjából azonban kritikus a műtrágyahasználat visszaszorítása és a biológiai nitrogénkötés jobb kihasználása (Zhang és mtsai., 2015).

1.2 Az ipari nitrogénkötés jelentősége és problémái

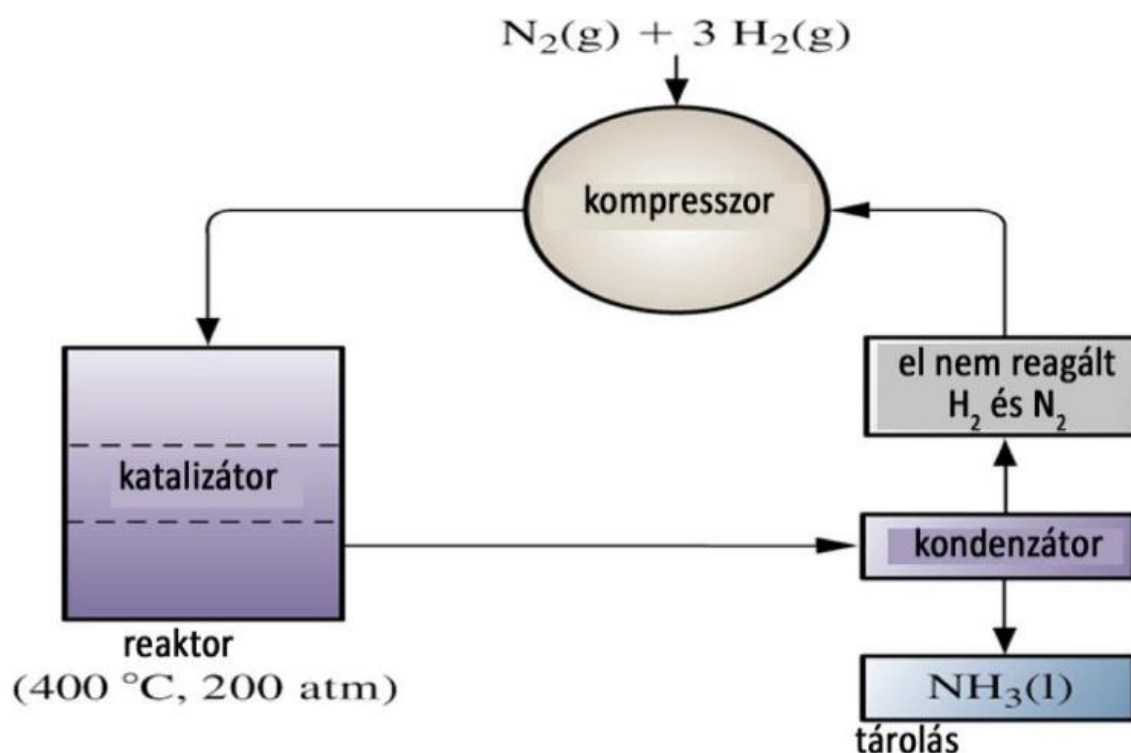
1.2.1 A Haber–Bosch eljárás hatása az élelmiszertermelésre

A Haber–Bosch eljárás a 20. század egyik legjelentősebb technológiai újítása, amely lehetővé tette a légköri nitrogén nagy mennyiségű megkötését ammónia formájában. Ezzel a módszerrel nagy mennyiségű szintetikus műtrágyát lehet előállítani, így megsokszorozódott a mezőgazdasági produktivitás, ami lehetővé tette a népesség exponenciális növekedését

(Erisman és mtsai., 2008). Az ammónia éves világméretű termelése meghaladja a 150 millió tonnát, és ennek jelentős részét műtrágyaként hasznosítják (Erisman és mtsai., 2008). Bizonyos becslések szerint a világ népességének közel fele nem jutna elegendő élelmiszerhez a Haber–Bosch eljárás nélkül (Smil, 2002).

1.2.2 A folyamat energiaigénye és környezeti következményei

Bár a Haber–Bosch eljárás alapvető szerepet játszott az élelmezésbiztonság kialakulásában, energiaigénye és környezeti hatásai hosszú távon komoly fenntarthatósági kérdéseket vetnek fel. Az ammónia előállítása során nagy nyomás (200–400 atmoszféra) és magas hőmérséklet (400–650 °C) szükséges a nitrogén molekula hármas kötésének megbontásához és a nitrogén hidrogénnel való egyesítéséhez, vasalapú katalizátor jelenlétében (1. ábra). Ez a folyamat fosszilis tüzelőanyagokra, főként földgázra támaszkodik, a globális energiafogyasztás 1–2%-át teszi ki és évente körülbelül 1,2%-kal járul hozzá a szén-dioxid-kibocsátáshoz (Erisman és mtsai., 2008).



1. ábra Az ammónia előállításának folyamata a Haber–Bosch-eljárásban. A nitrogént (N₂) és a hidrogént (H₂) a kompresszor összesűríti, majd a keverék a katalizátorral töltött reaktorba kerül, ahol 400 °C hőmérsékleten és 200 atmoszféra nyomáson ammónia (NH₃) képződik. A reaktorból kilépő gázkeveréket egy kondenzátor hűti le, amely során az ammónia folyékony halmazállapotúvá válik, és tárolásra kerül. Az el nem reagált nitrogén és hidrogén visszakerül a rendszerbe újabb ciklusra. Forrás: BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék. A nitrogénipar és ammóniagyártás (tananyag, elérés): http://kkft.bme.hu/attachments/article/42/03_A%20nitrog%C3%A9nipar%20%C3%A9s%20amm%C3%B3niagy%C3%A1rt%C3%A1s.pdf

A szükséges hőmérséklet és nyomás eléréséhez felhasznált energiát jelentős részben metánból nyerik, amelynek égése CO₂-kibocsátással jár (Galloway és mtsai., 2008).

A szintetikus műtrágyák túlzott alkalmazása gyakran eutrofizációhoz vezet a vízi ökoszisztémákban, ami algavirágzást és oxigénhiányt okozhat. Emellett a nitrogénműtrágyák használata során felszabaduló dinitrogén-oxid (N₂O) egy rendkívül erős üvegházhatású gáz (közel 300x veszélyesebb, mint a CO₂), ezáltal súlyosbítja a klímaváltozást (Erisman és mtsai., 2008).

Az ipari nitrogénkötés káros vonatkozásai miatt egyre fokozottabb kutatási és fejlesztési törekvések irányulnak alternatív eljárásokra.

A biológiai nitrogénkötés (BNF) az a folyamat, mely során egyes mikroorganizmusok a légköri nitrogént a növények számára hasznosítható formává alakítják. A Földön a megkötött nitrogén több mint 60%-a biológiai nitrogénmegkötésből származik. A leghatékonyabb módja a BNF-nek a hüvelyes növényeknek a rhizobium baktériumokkal való szimbiózisában valósul meg.

- Egy lehetséges alternatíva a BNF mellett az elektrokémiai ammóniatermelés, amikor a megújuló energiával végzett vízbontás (elektrolízis) során kapott hidrogént reagáltatják a levegőben található nitrogénnel. Az ammónia előállítása ezáltal kevesebb fosszilis energiát igényel, továbbá mérséklődik az üvegházhatású gázok kibocsátása is (Erisman és mtsai., 2008).
- Szóba jöhet még ezeken kívül a zöld hidrogén alkalmazása, mely a hagyományos (fosszilis) hidrogén helyett zöld hidrogént (vízbontás megújuló forrásból) felhasználva csökkenti az ammóniatermelés környezetre gyakorolt káros hatását (Smil, 2002).
- Másik oldalról a fenntartható mezőgazdasági gyakorlatok elterjedésével, melyek a precíziós és regeneratív mezőgazdaság eszközeivel (csepegtető öntözés, pontos műtrágyakijuttatás) optimalizálják a nitrogénfelhasználást. Ezen felül a körforgásos gazdálkodás (zöldtrágyázás, szerves trágya használat) révén mérsékelhető a talaj és a vizek nitrogénterhelése.

1.2.3 Zöldtrágyázás mezőgazdasági gyakorlata

A pillangósvirágúak (*Fabaceae* családba tartozó növények), mint például a szója, borsó és lucerna rendszeres termesztése jelentősen növeli a talaj nitrogéntartalmát, ami akkumulálódik, ezáltal elősegítve az utánuk termesztett növények jobb növekedését és csökkentve a műtrágya használat iránti igényt (Kebede, 2021). Ezenkívül az invazív fajok visszaszorításában is fontos

szerepet játszik a mezőgazdaságban a sorközművelés gyakorlatában. Így közvetve hozzájárul a növényvédő szerek kijuttatásának csökkentéséhez is.

Ezen összefüggések felhasználásával alakult ki a zöldtrágyázás, mely fenntartható alternatíva a műtrágyák helyettesítésére.

A zöldtrágyázás egy mezőgazdasági gyakorlat, amely során növényeket, -főként pillangósvirágúakat- vetnek be a talajba, és virágzás előtt beforgatják, hogy növeljék a talaj szerves anyag tartalmát és javítsák a talaj szerkezetét. A zöldtrágyázás nemcsak a talaj nitrogénellátását javítja, hanem elősegíti a talaj mikrobiális aktivitásának fokozódását, csökkenti a talajeróziót, és növeli a talaj vízmegtartó képességét. Ez a megoldás jelentősen csökkentheti a műtrágyák használatából eredő környezeti terhelést és gazdasági költségeket (Sumiahadi és Acar, 2020).

1.3 A biológiai nitrogénkötés természetes folyamata

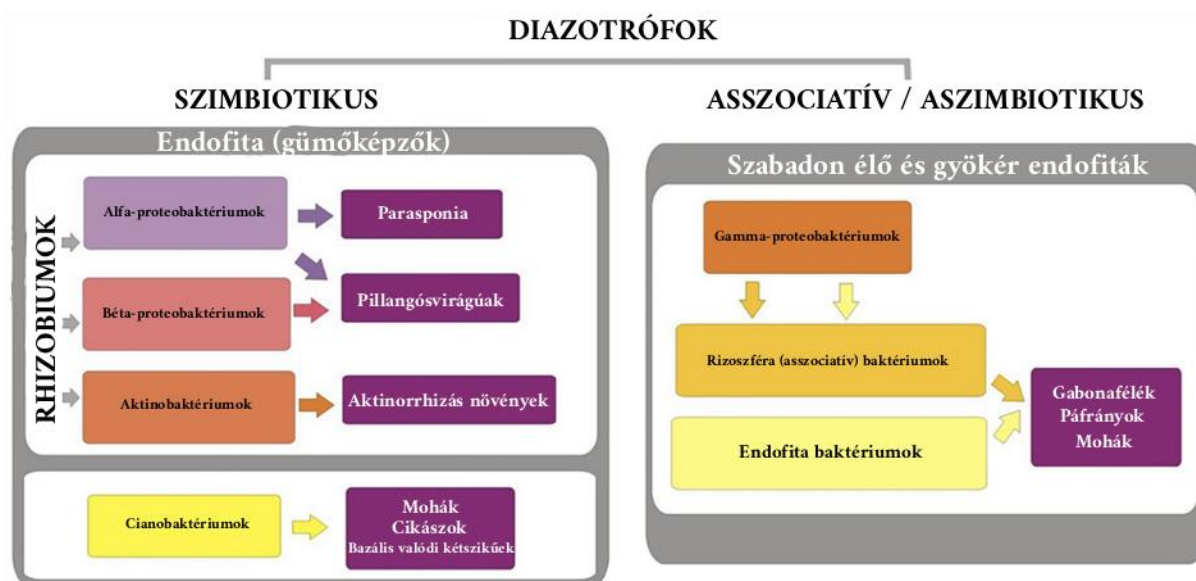
1.3.1 Nitrogénkötő mikroorganizmusok és szerepük az ökológiai körforgásban

A BNF során a diazotróf mikroorganizmusok (baktériumok és archaeák) képesek a levegő dinitrogénjét (N_2) a növények számára hasznosítható ammóniává (NH_3) alakítani. Ezeknek a mikroorganizmusoknak egy része szabadon élve vagy valamilyen növényi partnerrel asszociatív vagy szimbiotikus kapcsolatban képes a nitrogén megkötésére (2. ábra). A folyamat különösen fontos azokban az ökoszisztémákban, ahol a talaj eleve alacsony nitrogéntartalmú, mivel ilyenkor a BNF jelenti az elsődleges nitrogénforrást (Masuda és mtsai., 2020). A szabadon élő baktériumok, például az *Azotobacter* és *Clostridium* fajok önállóan végzik a nitrogénkötést, kiegészítve ezzel a talaj tápanyagháztartását akkor is, ha nincs jelen szimbiotikus gazdanövény (Masuda és mtsai., 2020). Ezzel szemben az olyan asszociatív módon együtt élő diazotrófok, mint az *Azospirillum* fajok, a növényi gyökérfelszínhez kötődve támogatják a növekedést és a nitrogén-felvételt anélkül, hogy klasszikus, intracelluláris szimbiózist alakítanának ki (Steenhoudt és Vanderleyden, 2000).

A szimbiotikus kapcsolatra képes baktériumok lehetnek olyan mikroorganizmusok (például rhizobiumok), amelyek gyökérgümőben élnek együtt a gazdanövényekkel. A pillangósvirágúak (*Fabaceae*) és a rhizobium talajlakó baktériumok együttműködése erre a legismertebb példa. A baktériumok a növényi sejtekben ammóniát termelnek, míg a növény szerves anyagokkal látja el a baktériumokat (Graham és Vance, 2003). Hasonló elven működik az aktinorrhizas kapcsolat is (például égerfajok és a *Frankia* Gram-pozitív baktérium között).

Kiseb hatékonysággal cianobaktériumok (*Anabaena*, *Nostoc*) is képesek a légköri nitrogént hasznosíthatóvá tenni, szabadon élve vagy algákkal, vízi növényekkel együttműködve. Ezek a mikroorganizmusok különösen fontosak a vízi ökoszisztémák tápanyag-ellátásában (Masuda és mtsai., 2020).

Szintén fontos megemlíteni a mikorrhiza gombák és magasabb rendű növények együttélését, mely során a gombák elősegítik a növény számára a talajból történő tápanyagfelvételt, beleértve a nitrogént is. Ezért a mikorrhiza-kapcsolat, amely általános a növényeknél, alapvető jelentőségű lehet a talaj termékenységének fenntartásában (Masuda és mtsai., 2020).



2. ábra A szimbiotikus és asszociatív diazotróf mikroorganizmusok csoportjai. A diazotrófok képesek a légköri nitrogént ammóniává redukálni. A diazotróf baktériumok növényi kapcsolatait bemutató ábra (Mus és mtsai., 2016, 1. ábra alapján átdolgozva).

1.3.2 A nitrogenáz enzimkomplex szerepe a diazotróf mikroorganizmusokban

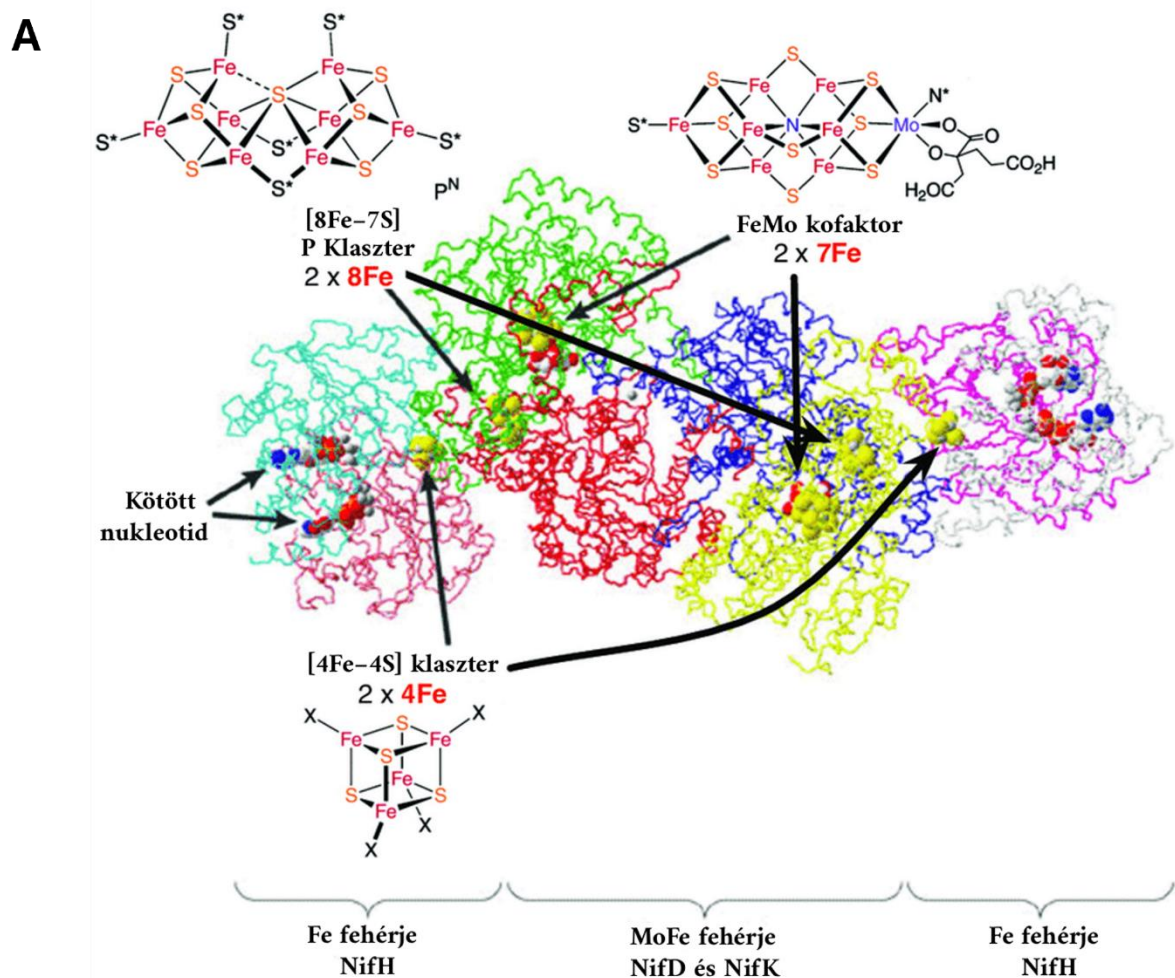
A levegő dinitrogén (N_2) biológiai megkötéséért a nitrogenáz enzimkomplex felelős, amely kizárólag a diazotróf szervezetek (baktériumok és archaeák) egyes csoportjaiban található meg. Valószínűsíthető, hogy ez az enzimkomplex evolúciósan egy eredetileg hidrogén-cianid redukálására képes detoxifikáló enzimből alakult ki, majd vertikálisan és horizontálisan is elterjedt, illetve többször elveszett a különböző törzsekben az evolúció folyamán (Hartmann and Barnum, 2010).

A nitrogenáz két komponensből épül fel (3. A ábra):

- az elektronátadó Fe fehérjéből (*nifH* gén terméke),
- valamint a MoFe fehérjéből, amelyet a *nifD* és a *nifK* gének kódolnak.

A Fe fehérje vas-kén klaszterén [4Fe-4S] keresztül két ATP-molekula hidrolízisének kíséretében elektront továbbít a MoFe fehérjének, melynek aktív helyén a P klaszter és a FeMo klaszter található (Seefeldt és mtsai., 2009). A homocitrát-szintetizáló gén (*nifV*) sok rhizobium törzsben hiányzik, ezért a homocitrát előállítását a szimbiotikus partner (növény) biztosítja (Hakoyama és mtsai., 2009; Nouwen és mtsai., 2017). A dinitrogén (N₂) ammóniává (NH₃) történő redukciója 16 ATP felhasználásával megy végbe, az egyes lépések során felszabaduló elektronok és protonok felhasználásával (3. B ábra; Seefeldt és mtsai., 2009).

A legtöbb rhizobiumnál a teljes nitrogenáz működéshez a gazdanövény is hozzájárul, míg a nem szimbiotikus diazotróf baktériumok önmagukban is rendelkeznek az összes szükséges génnel, és szabadon élő állapotban köthetik meg a légköri nitrogént, majd juttathatják a táplálékláncba (Kennedy és mtsai., 2004).

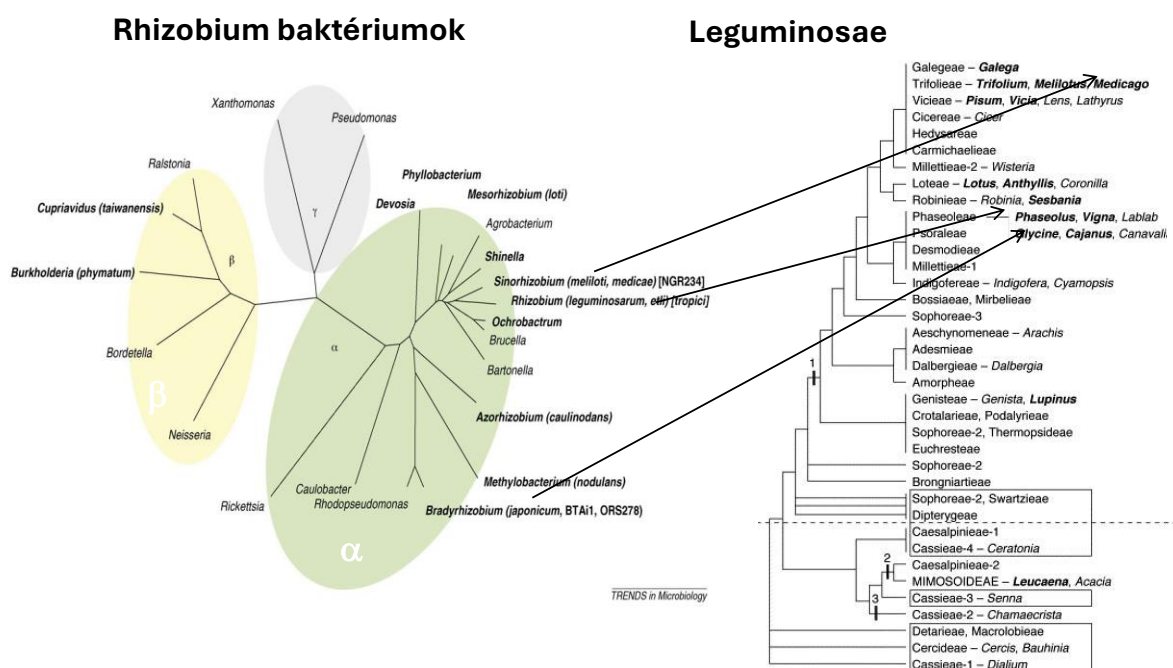


3. ábra A nitrogenáz enzimkomplex felépítése és működése (Snow, 2014). A sémán látható a Fe fehérje (*nifH*), a MoFe fehérje (*nifD*, *nifK*), valamint a FeMo klaszter és a P klaszter, ahol a légköri nitrogén ammóniává történő redukciója megy végbe (A). A reakció egyenlete, melyet a nitrogenáz enzimkomplex katalizál (B).

1.3.3 A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának evolúciója

Gümőképzésre a Rosid kládon belül a Fabales rend legtöbb faja képes, míg a Cucurbitales, Fagales és Rosales rendek esetében csupán néhány fajról beszélhetünk (Soltis és mtsai., 1995; Griesmann és mtsai., 2018). A feltételezések szerint eredetileg a gümőképzéssel járó szimbiózist a Frankia-kkal alakított ki a Rosid klád őse. Ez a kapcsolat az aktinorrhizás növényeknél maradt fent. Ezt a Gram-pozitív baktérium csoportot azonban az ősi hüvelyeseknél és a *Parasponia* nemzetségnél (Rosales) a Gram-negatív rhizobiumok váltották fel (Velzen és mtsai., 2019).

A rhizobium nemzetség parafiletikus csoportot alkot, fajai az α -proteobaktériumok (Rhizobiales) vagy a β -proteobaktériumok (Burkholderiales) körébe sorolhatók (4. ábra). A *Papilionoideae*, bükkönyformák (az ábrán a szaggatott vonal felett) szimbiótái az α -proteobaktériumok közül kerülnek ki, míg a *Caesalpinioideae*, lepényfaformák (az ábrán a szaggatott vonal alatt) szimbiótái elsősorban a β -proteobaktériumok.



4. ábra A hüvelyes növények (*Leguminosae*) és a *Rhizobium* baktériumok közötti szimbiózis filogenetikája. Bal oldalt a proteobaktériumok 16S rRNS génalapú törzsfája látható (α : alfa-proteobaktériumok, β : béta-proteobaktériumok, γ : gamma-proteobaktériumok), kiemelve a szimbiózisra képes nemzetségek (rhizobiumok). Jobb oldalt a hüvelyesek (*Fabaceae*) családja látható példánövényekkel. Minden növénynek megvan a maga jellegzetes rhizobium partnere, amely a leghatékonyabb nitrogénkötést biztosítja. (A kép saját szerkesztés, részben Hassen és mtsai., 2020, részben Lavin és mtsai., 2005 ábrája alapján).

1.4 A *Medicago truncatula*, mint kutatási modellnövény

A *M. truncatula* a *Fabaceae* család modellnövénye, amelyet széles körben alkalmaznak a növény-mikroba szimbiotikus kapcsolatok, a nitrogénkötés és a növényi genomika területén végzett kutatásokban. Ezt a növényt kisméretű, diploid genomja (~500 Mbp) és gyors életciklusa teszi alkalmassá a genetikai vizsgálatokhoz (Krishnakumar és mtsai., 2015).

A *M. truncatula* egyik előnye, hogy önbeporzó és könnyen transzformálható. Emellett a *M. truncatula* genetikai stabilitása és homogén populációk létrehozásának képessége hozzájárul a kutatások megbízhatóságához és reprodukálhatóságához (Young és mtsai., 2011).

1.4.1 Genomikai források és eszközök

A *M. truncatula* genomjának szekvenálása és annotációja jelentős előrelépést hozott a pillangósvirágú növények genetikai kutatásában. A teljes genom szekvenálás alapvető betekintést nyújtott a szimbiózis-alapú nitrogénkötés molekuláris mechanizmusainak megértésébe (Gage, 2004; Oldroyd és Downie, 2008).

A *M. truncatula* genom program keretében létrehozott expressziós szekvencia (EST) gyűjtemény lehetővé tette a génexpressziós profilok részletes vizsgálatát. Az összeállított EST adatbázisok jelentős mértékben hozzájárultak a gének funkcióinak meghatározásához. (He és mtsai., 2009).

Az EST-alapú gyűjteményt követően a *M. truncatula* A17 ökotípus genomjának hozzáférésre két, egymást továbbfejlesztett referencia-genom készült el a 2014-es Mt4.0 és a 2018-as, Mt5.0, amelyek lehetővé tették a gének funkcionális és populációgenomikai vizsgálatait.

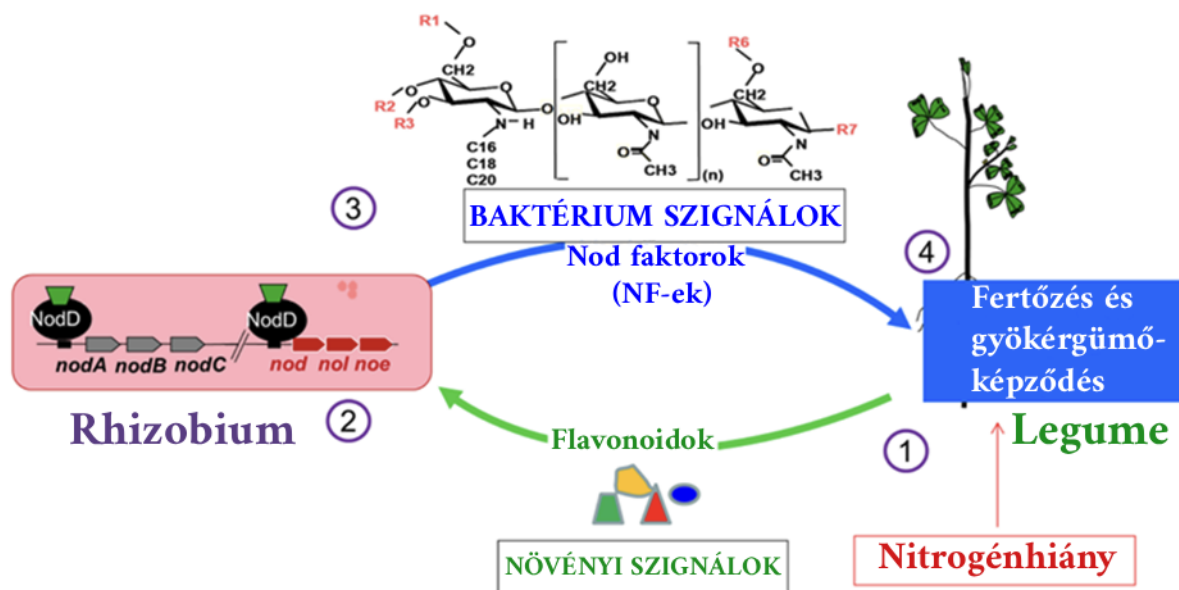
1.5 A szimbiózis kialakulásának molekuláris háttere

1.5.1 A Nod faktorok szerepe a növény-baktérium kommunikációban és gümőfejlődésben

A pillangósvirágú növények és a rhizobium baktériumok közötti szimbiotikus kapcsolat, amely lehetővé teszi a partnerek felismerését és egymásra találását a talajban, a Nod (nodulációs) faktorok által közvetített kommunikáción alapszik. A Nod faktorok lipochito-oligoszacharid (LCO) jelzőmolekulák, amelyeket a baktériumok termelnek válaszul a növényi gyökerek által a nitrogén hiányában kibocsátott flavonoidokra (és izoflavonoidokra). A flavonoidok aktiválják a NodD transzkripció faktort, amely a Nod gének expresszióját szabályozza, biztosítva ezzel a Nod faktorok szintézisét (Rostas és mtsai., 1986; Kondorosi és mtsai., 1984). A Nod faktorok szerkezete fajspecifikus módosításokat tartalmaz, például acetilációt vagy szulfát csoport

beépítését, amelyek meghatározzák a gazdanövény és baktérium közötti specifikusságot (Mergaert és mtsai., 1997).

A növényi gyökérsejtek plazmamembránján található LysM-típusú receptor kinázok érzékelik a Nod faktorokat. A receptorok aktiválása elindítja az elsődleges szimbiotikus jelátviteli útvonalakat (5. ábra), melynek eredményeképpen elkezdődik a gyökérszőr görbülése, az infekciós fonalak kialakulása és a belső kéregsejtek osztódása, végső soron a gyökérgümők kialakulása (Gage, 2004; Oldroyd és Downie, 2008).



5. ábra A pillangósvirágú növények és *Rhizobium* baktériumok közötti szimbiotikus kapcsolat kialakulását egy összetett, kémiai jeleken alapuló kommunikáció előzi meg. Nitrogénhiányos körülmények között (1) a növény gyökerei flavonoid típusú molekulákat termelnek, amelyek a talajban élő rhizobium partnerben aktiválják a Nod gének expresszióját (2), ez a folyamat a Nod faktorok termelését eredményezi (3), melyek felismerésével a növényben beindul a fertőzési folyamat és a gyökérgümők képződése (4). (Gage, 2004).

1.5.2 A növényi és baktérium jelátviteli utak koordinációja

A szimbiózis kialakulása során a növényi és bakteriális jelátviteli utak összehangolt működése szükséges. Miután a növény érzékeli a Nod faktorokat kalcium-hullámok jelennek meg az epidermális sejtjeiben. Ezek a kalciumjelzések kulcsszerepet játszanak az elsődleges jelátvitelben, melyet olyan gének aktiválása követ, mint például az NSP1 és NSP2 (Nodulation Signaling Pathway). Ezek szabályozzák az infekciós fonalak képződését és a gyökérgümők fejlődését (Gage, 2004). Ezzel párhuzamosan beindul a gyökérgümő fejlődési program, amely a kéregsejtek osztódását és differenciálódását idézi elő. Az infekciós fonalak révén a baktériumok behatolnak a növényi sejtjekbe, ahol bakteroidokká differenciálódnak.

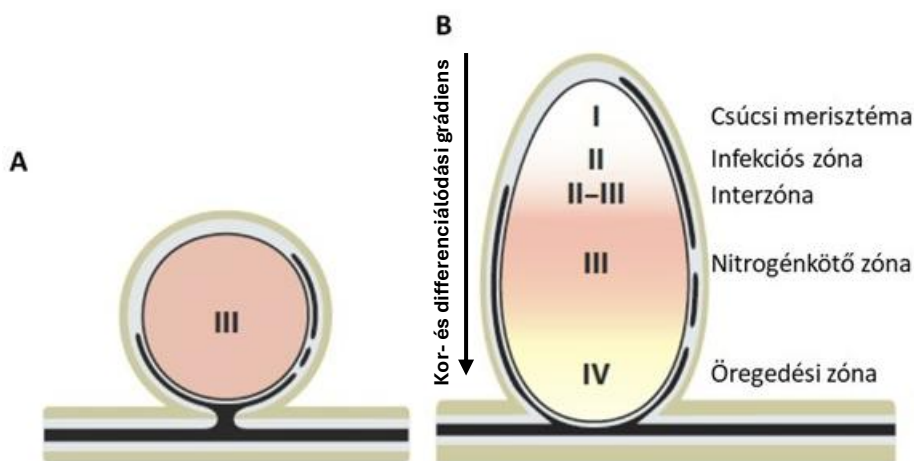
Ezzel egyidőben a növény leghemoglobint (Lb) termel, amely az oxigén megkötésével alacsony oxigénszintet biztosít a gümőkben, ezzel optimális körülményeket biztosítva a nitrogénáz enzim számára (Oldroyd és Downie, 2008). A folyamatos kommunikáció fenntartásának érdekében mindkét fél szabályozza saját metabolikus aktivitását: míg a növény biztosítja az energiaforrást és egyéb molekulákat, például homocitrátot, vasat, valamint az oxigén-szint kontrollálását, addig a baktérium az ammóniatermelésre fordítja a saját és a növénytől kapott erőforrásokat és csökkenti vagy meg is szünteti a patogenitás markereinek expresszióját. A bakteriális felszíni poliszacharidok – az exopoliszacharidok (EPS), a lipopoliszacharidok (LPS) és a rizobiumokra jellemző kapszuláris poliszacharidok (KPS) szintén kulcsszerepet játszanak az infekció és a növény–mikroba kompatibilitás szabályozásában. (Gage, 2004).

1.6 A gümők fejlődése és morfológiai típusai

A gümő a gyökér kéregszöveiteiből kialakuló speciális szimbiotikus szerv, melynek a két fő típusát különíthetjük el.

A determinált gümők gömbölyűek, fejlődésük során leáll a merisztéma aktivitása (amint a bakteroidok elkezdenek nitrogént kötni), a központi rész tartalmazza a szimbiotikus sejteket azonos állapotban (6. A ábra). A merisztéma záródás után a növekedésük kizárólag sejtnagyobbodás révén történik. Ez a típus jellemző például a szójára (*Glycine max*) és a szarvaskerepre (*Lotus japonicus*).

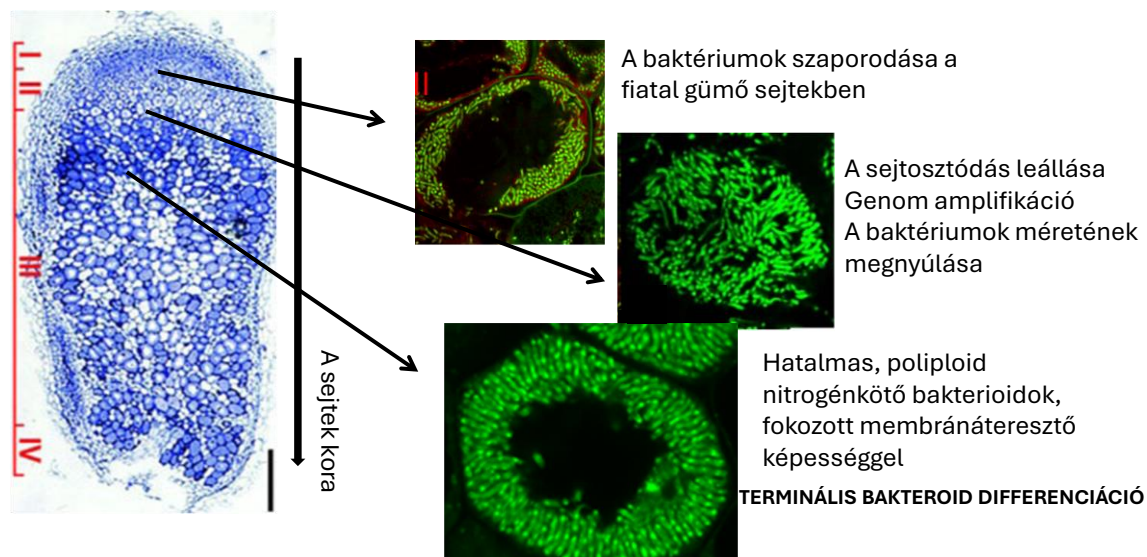
Az indeterminált gümők hosszúkaság, mivel folyamatosan aktív merisztémát tartanak fenn és összetett szövettani struktúrával rendelkeznek. Az új sejtek folyamatosan képződnek, miközben különböző funkcionális zónák alakulnak ki, így egy kor- és fejlődési grádiens jön létre (6. B ábra).



6. ábra A determinált és indeterminált gümők sematikus szerkezete.
A determinált gümő szerkezeti felépítése (A). Az indeterminált gümő sematikus ábrája (B), amely a sejtek fokozatos fejlődését és rétegződését ábrázolja. A különböző funkcionális zónák jól elkülöníthetők: I – merisztmatikus zóna, II – infekciós zóna, II-III – interzóna, III – nitrogénkötő zóna, IV – öregedési zóna. (Kondorosi és mtsai., 2013).

A merisztmatikus zónában (ZI) történik az aktív sejtosztódás, míg az infekciós zónában (ZII) a rhizobium baktériumok az infekciós fonálon keresztül bejutva szimbioszómákat képeznek. A szimbioszóma egy olyan speciális növényi eredetű képződmény, ahol a növényi plazmamembrán eredetű membrán, a peribakteroid membrán (PBM), körülveszi a bakteroidokat a gazdanövény sejtjein belül, így izolálva őket a növényi sejt citoplazmájától és létrehozva egy különálló organelum-szerű struktúrát, ahol a nitrogénkötési folyamat zajlik. Ebben a zónában indulnak el a növényi sejtek endoreduplikációs ciklusai, melynek során sejtméretük és DNS-tartalmuk jelentősen megnő, miközben a baktériumok még szaporodnak. Az interzónában (IZ) a bakteroidok elveszítik sejtosztódási képességüket, és genomjuk amplifikációja, valamint sejtjeik megnyúlása következik be. Ez a folyamat a terminális bakteroid differenciáció (Mergaert és mtsai., 2006). Az amiloplasztokban nagy mennyiségű keményítőt halmoznak fel, felkészülve az aktív nitrogénkötésre (Vasse és mtsai., 1990). A végső, nitrogénkötő zónában (ZIII) helyezkednek el a terminálisan differenciálódott, poliploid, megnagyobbodott bakteroidok, amelyek hatékonyan képesek ammóniát előállítani a légköri nitrogénből, biztosítva a növény nitrogénellátását (Xiao és mtsai., 2014). A gümő legidősebb részében található a szeneszcens zóna (ZIV), ahol az infekciós fonalaktól kiszabaduló és peribakteroid membrán nélküli, szaprofitává váló rhizobiumok (rhizoboidok) újrahasznosítják a bakteroidok és a növényi sejtek törmelégeit (Timmers és mtsai., 2000; 7. ábra).

Az indeterminált gümők szerkezeti komplexitása jellemző az összes Inverted Repeat Lacking Clade (IRLC) csoportba tartozó növényfajra, például a *M. truncatula*-ra, lucernára (*M. sativa*), a borsóra (*Pisum sativum*), lencsére (*Lens culinaris*), csicseriborsóra (*Cicer arietinum*), lóbabra (*Vicia faba*), édesgyökérre (*Glycyrrhiza glabra*), lilaakárcra (*Wisteria sinensis*) is (Oono és mtsai., 2010; Łotocka és mtsai., 2012).



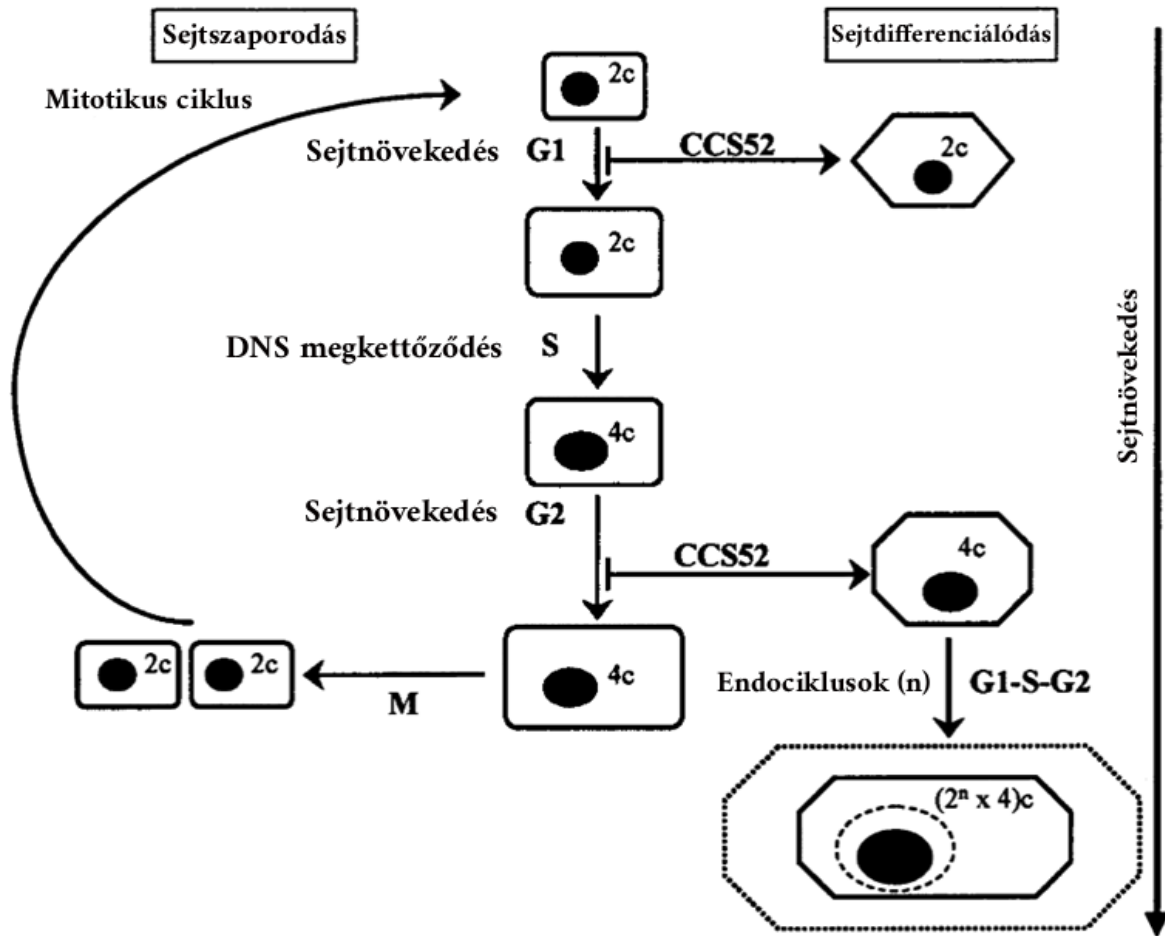
7. ábra Az indeterminált gümő felépítése és a baktériumok terminális differenciációja. A gümő csúcsától az alapja felé haladva az apikális merisztéma (ZI) sejtjei folyamatosan osztódnak. Az alatta található fertőzési zónában (ZII) a növényi sejtek mérete és DNS-tartalma növekszik, miközben a baktériumok még szaporodnak. Az interzónában (IZ) a bakteroidok sejtjei megnyúlnak, elveszítik osztódási képességüket és poliploiddá válnak. A nitrogénkötő zónában (ZIII) a terminálisan differenciálódott, nagy méretű bakteroidok hatékonyan kötik meg a légköri nitrogént. A sejtek öregedésével létrejön a szeneszcens zóna (ZIV), amely a szimbiózis végső szakaszát jelzi. (Maróti és Kondorosi, 2014 alapján, módosítva.)

Az indeterminált típusú *M. truncatula* gümőben keményítő halmozódik fel az interzóna sejtjeiben a nitrogénkötési folyamat indulása előtt (Vasse és mtsai., 1990). Ineffektív vagy korai szeneszcens gümőket képző mutánsokban – például a korai szeneszcenciájú *esn1* (*early senescent nodule 1*) vonalban fokozódik a keményítőszemcsék mennyisége, amely szorosan összefügg a bakteroidok anyagcseréjének leállásával és a nitrogenáz aktivitás hiányával vagy megszűnésével (Xi és mtsai., 2013). A jelenséget a baktériumok szén-anyagcseréjének megváltozása, konkrétan a dikarboxilátok -pl. malát- felhasználásának zavara idézi elő, a fel nem használt szénforrás keményítő formájában raktározódik a növényi amiloplasztokban (Prell és Poole, 2006).

1.7 Endoreduplikáció a gümőfejlődés során

A merisztémából kilépő növényi sejtek a továbbiakban már nem osztódnak, ugyanakkor az endoreduplikációs ciklusok révén genomjuk többször megduplázódik. Ennek során a DNS tartalom 2C értékről (ahol 1C a haploid genom DNS-tartalma) egészen 64C értékig nőhet, 4C, 8C, 16C és 32C átmeneti ploidiaszinteken keresztül, ami jelentős sejtméret-növekedéssel jár (Cebolla és mtsai., 1999). A *M. truncatula* gyökérgümőkben elért 32C–64C ploidiaszintű sejtek akár 80-szor nagyobb méretűek lehetnek, mint a merisztematikus sejtek (Kondorosi és Kondorosi, 2004; Kondorosi és mtsai., 2013).

Az endoreduplikáció kialakulását a *ccs52A* fehérje irányítja, amely az anafázis-promótáló komplex (APC) E3 ubiquitin ligáz szubsztrát-specifikus aktivátoraként működik, elősegítve a mitotikus ciklinek lebontását. Ennek eredményeként a sejtosztódás (mitózis) gátlódik, míg a DNS-szintézis folytatódik, biztosítva a genom többszörös duplikációját (8. ábra; Cebolla és mtsai., 1999). A *ccs52A* hiányában az endociklus nem jön létre, és a gümősejtek differenciálódása megakad, ami megmutatja az endoreduplikáció alapvető szerepét a gümők fejlődésében (Vinardell és mtsai., 2003).



8. ábra A *ccs52* fehérje endociklusokban betöltött szerepe. A proliferálódó sejtekben (G1–S–G2–M fázisok) a sejtnövekedést az egyes kontrollpontok (G1, G2) szabályozzák. A *ccs52* aktiválja az anafázis-promótáló komplex proteolitikus működését, ami a mitotikus ciklinek lebomlásához vezet, és gátolja a mitózist. Ezzel a sejt kilép a mitotikus sejtciklusból (például a G1 vagy G2 fázisban) és endoreduplikációs ciklusokra vált, amelyek egymást követően növelik a genom DNS-tartalmát (2C-ről 4C, 8C, 16C, 32C, 64C), lehetővé téve a gyors és jelentős sejtméret-növekedést (Az ábra forrása Cebolla és mtsai., 1999).

1.8 A Bakteroid differenciáció és szabályozás

A differenciáció során a bakteroidok genetikai és szerkezeti változásokon mennek keresztül. A differenciáció formája gazdanövény-függő (Mergaert és mtsai., 2006). Egyes növényekben, mint például a szójában (*Glycine max*) és a *L. japonicus*-ban, a bakteroidok megtartják eredeti

méretüket, formájukat, genomjuk nem változik számottevően, és osztódóképességük is megmarad (Mergaert és mtsai., 2003; Van de Velde és mtsai., 2010). Ezekben az esetekben a bakteroidok szimbiotikus és szabadon élő állapota a fertőzési ciklus során, a növényi gyökérgümőbe való bejutáskor és a növényből történő felszabaduláskor váltakozhat. Más fajokban, például a *M. truncatula*-ban és a borsóban, a bakteroidok terminális, visszafordíthatatlan átalakuláson mennek keresztül. Méretük jelentősen megnő, akár többszörösére (24C), és gyakran elágazó, Y-alakú struktúrákat hoznak létre (Mergaert és mtsai., 2006). Ezzel párhuzamosan a baktériumsejtek genomja endoreduplikálódik, sejtfaluk és membránjuk permeabilitása fokozódik, valószínűleg segítve a metabolikus kommunikációt a gazdanövény és a baktérium között. Elvesztik osztódási képességüket, így terminálisan differenciálódnak. A terminális differenciáció többször egymástól függetlenül is kialakult a pillangósvirágúak egyes csoportjaiban például az IRLC és a Dalbergioid kládokban (Oono és mtsai., 2010), amely arra utal, hogy ez evolúciós előnyt biztosíthat a gazdanövény számára. Ezt a pozitívítást vélhetően a bakteroidok fokozott nitrogénfixáló hatékonysága adja. Ennek oka lehet, hogy a visszafordíthatatlanul differenciált baktériumok jobban rá vannak utalva a növény által szolgáltatott energiaforrásokra, amelyeket a növény által felhasználható nitrogénformák visszajuttatásával viszonyoznak. Ezt az elképzelést kísérleti eredmények is alátámasztják: ugyanazon baktérium törzsből kialakult terminálisan differenciálódott bakteroidok nitrogénáz aktivitása magasabb volt, mint a reverzibilisen differenciálódó baktériumoké (Oono és mtsai., 2010; Chen és mtsai., 2023). Az IRLC kládban tapasztalható terminális differenciáció fenotípusa jelentős eltérést mutathat: például a *Glycyrrhiza uralensis* esetében enyhe megnyúlás figyelhető meg, míg a *M. truncatula* esetében a differenciált bakteroidok jelentősen nagyobb méretűvé és elágazóvá válnak. Emellett előfordulhat gömb alakú (szferoid) típus is (Montiel és mtsai., 2017).

1.9 Gümőspecifikus peptidek típusai és szerepük a nitrogénkötő szimbiózisban

A gümőspecifikus peptidek alapvető szerepet játszanak a bakteroidok terminális differenciációjában és a nitrogénkötő aktivitás fenntartásában. Az IRLC csoportba tartozó pillangósvirágú növényekben három fő peptid család játszik közvetlen szerepet a szimbiotikus folyamatokban: az NCR (nodule-specific cysteine-rich) peptidek és a glicin-gazdag nodGRP (nodule-specific glycine-rich protein) peptidek, valamint a viszonylag újonnan leírt SNARP-ok -kis gümőspecifikus, savas aminosavakban gazdag peptidek- (small nodule-acidic-rich peptides), amelyek kis méretük és savas aminosav-összetételük révén finomhangolják a

bakteroidok terminális differenciációját (Kereszt és mtsai., 2018). Vannak egyéb gümőspecifikus peptidek, például a nodulinok vagy a CAML-ek (gümő-specifikus kalmodulin-szerű fehérjék), de ezek nem vesznek részt közvetlenül a bakteroid differenciációban (Guefrachi és mtsai., 2014).

1.9.1 NCR peptidek: szerkezeti és funkcionális jellemzők

Az NCR peptidek gümőspecifikus, ciszteinben gazdag peptidek, amelyek feltehetőleg defenzinekből evolválódtak. A defenzinek olyan kis méretű, ciszteinben gazdag antimikrobiális peptidek, amelyeket növényekben, állatokban és emberekben is előfordulnak, fő feladatuk a kórokozók (például baktériumok és gombák) elleni védekezés. A *M. truncatula*-ban mintegy 700 különböző NCR peptidet azonosítottak, melyek kizárólag a szimbiotikus gümő szöveteiben expresszálódnak és szekréciós úton a szimbioszómába, illetve a bakteroidokba jutnak (Mergaert és mtsai., 2003; Van de Velde és mtsai., 2010). Az endoplazmatikus retikulumban (ER) működő szignál peptidáz komplex (SPC) levágja az NCR szignál peptidet, majd a transzláció befejeztével az érett NCR peptidek a Golgi-készüléken keresztül transz-Golgi vezikulumokban szállítódnak a szimbioszómákhoz, ahol kapcsolatba léphetnek a bakteroidokkal (Van de Velde és mtsai., 2010; Wang és mtsai., 2010; Guefrachi és mtsai., 2014).

Az NCR peptidek expressziója térben és időben szigorúan szabályozott folyamat a *M. truncatula* gümőiben (9. ábra). Ezek a peptidek három fő kémiai csoportba sorolhatók: anionos, neutrális és kationos NCR-ek. A gümőfejlődés kezdeti szakaszában, a fiatal infekciós sejtekben (fertőzési zóna, ZII), az NCR-ek mennyisége alacsony, és ezek között túlnyomó részt anionos NCR-ek fordulnak elő. Ezzel szemben az interzónában (IZ) történik az NCR peptidek expressziójának nagymértékű fokozódása, ahol a gümő teljes NCR génexpressziójának több mint fele (57%) zajlik (Roux és mtsai., 2014; Downie és Kondorosi, 2021). Ebben a zónában kiemelkedően magas a kationos NCR peptidek aránya, ami összefüggésben áll a bakteroidok terminális differenciációjának kezdetével. A nitrogénkötő zónában (ZIII) az NCR-ek mintegy 27%-a fejeződik ki, ahol már főként az érett, poliploid bakteroidok találhatók, amelyek aktív nitrogénkötést végeznek (Roux és mtsai., 2014).

Merisztéma

Fertőzési Disztális (1%)

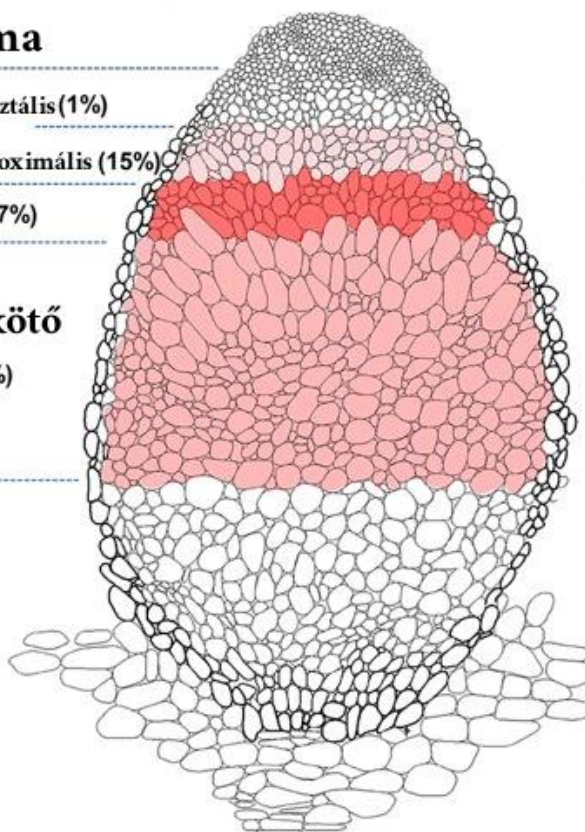
zóna

Proximális (15%)

Interzóna (57%)

Nitrogénkötő

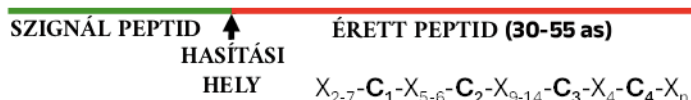
zóna (27%)



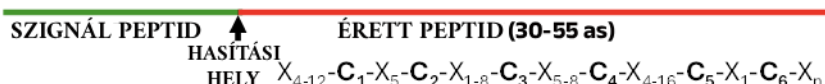
9. ábra Az NCR peptidek expressziós mintázata a *M. truncatula* gyökérgümőben. A különböző fejlődési zónák (merisztéma, fertőzési zóna, interzóna és nitrogénkötő zóna) NCR génkifejeződésének mértékét a sejtek színének intenzitása jelzi (világostól a sötétvörösig). Az NCR-ek többsége (57%) az interzónában expresszálódik, ahol a bakteroidok terminális differenciációja történik (Roux és mtsai., 2014; Montiel és mtsai., 2017; Downie és Kondorosi, 2021).

Az NCR peptidek jellemzően egy rövid szignálpeptidet tartalmaznak az N-terminális régióban, amely az érett peptid képződése során lehasad. Az érett peptidek hossza rendszerint 30–55 aminosav és szerkezeti jellemzőjük a 4–6 cisztein aminosav (10. ábra), melyek 2–3 diszulfid híd kialakítására képesek és stabilizálhatják a peptid szerkezetét (Maróti és mtsai., 2015; Lima és mtsai., 2020).

Nodule-specific Cysteine-Rich peptides (4 Cys)



Nodule-specific Cysteine-Rich peptides (6 Cys)



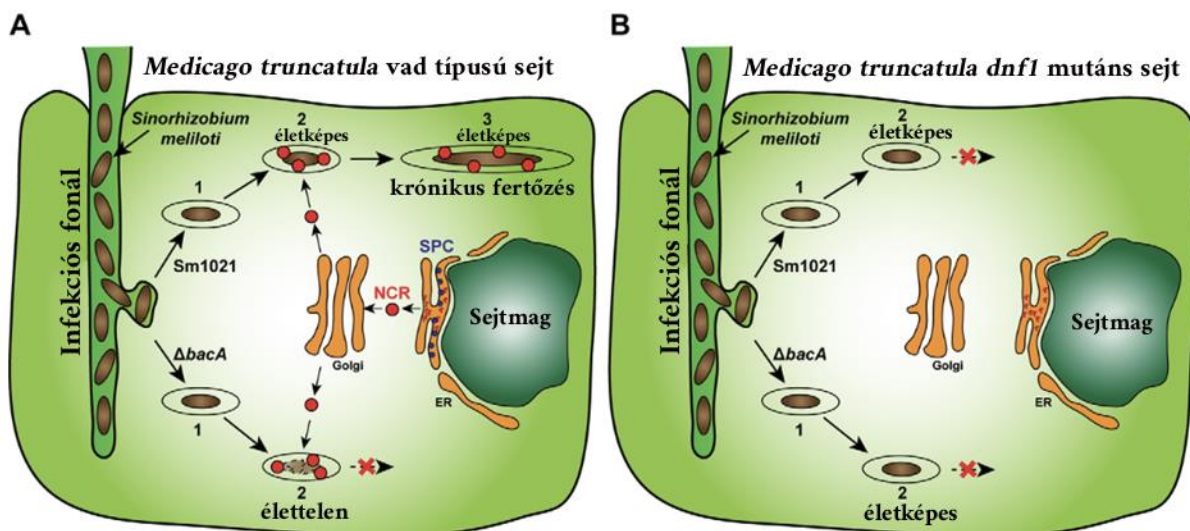
10. ábra Az NCR peptidek általános szerkezeti jellemzői. A rövid N-terminális szignálpeptid a hasítási helyen lehasad, ezt követően alakul ki a 30–55 aminosavból (as: aminosavak) álló érett peptid. Az NCR-ek jellegzetes vonása a 4 vagy 6 cisztein (Cys, C) konzervált jelenléte, melyek intramolekuláris diszulfid hidakat képezve biztosítják a peptid szerkezetének stabilitását (Maróti és mtsai., 2015; Lima és mtsai., 2020).

Az NCR peptidek szimbiotikus funkciói széleskörűek, szerepük van a bakteroidok membrán áteresztőképességének növelésében, a bakteroidok megnyúlásában, illetve az osztódó és szaporodó képesség végleges elvesztésében (Mergaert és mtsai., 2006; Farkas és mtsai., 2014; Lima és mtsai., 2020). Néhány NCR peptidről bizonyított, hogy esszenciális a normális gümőfejlődéshez, például az *NCR169* delécioja kisebb méretű, kevésbé differenciált bakteroidokat eredményez, ami a gümők nitrogénkötő képességének elvesztését eredményezi a *dnf7-2* nitrogén-fixációra képtelen (Fix^-) mutánsban (Horváth és mtsai., 2015). További fontos NCR peptidek az *NCR247*, *NCR211*, *NCR343* és *NCR-new35*, amelyek nélkülözhetetlenek a bakteroidok teljes differenciációjához (Farkas és mtsai., 2014; Kim és mtsai., 2015; Sankari és mtsai., 2022; Horváth és mtsai., 2023).

Az NCR peptidek a bakteroidok differenciációját és stabilitását nemcsak membrán kölcsönhatásaikon, hanem intracelluláris hatásaikon keresztül is szabályozzák. Képesek bejutni a bakteroidok belsejébe a BacA transzportfehérje segítségével, amely elősegíti a peptidek sejten belüli felvételét és mérsékli azok toxikus hatását, ezáltal elengedhetetlen a baktériumok NCR peptidekkel szembeni rezisztenciájához, valamint a differenciált bakteroid állapot hosszú távú fenntartásához (11. ábra; Guefrachi és mtsai., 2015; diCenzo és mtsai., 2017).

Az NCR peptidek aktivitását poszttranszlációs módosítások, például foszforiláció vagy acetiláció is szabályozhatják, amelyek további kontrollt jelentenek a bakteroidok differenciációja és működése során (Marx és mtsai., 2016). Emellett epigenetikai szabályozási mechanizmusok, mint például DNS-metiláció, hisztonmódosítások vagy kis RNS-ek közvetítette génszabályozás, is részt vesznek az NCR peptidek expressziójának szabályozásában (Nagymihály, 2017).

Bár az NCR peptidek jellemzően az IRLC klád növényeire specifikusak, hasonló, NCR-szerű (NCR-like) peptideket és ezek által indukált terminális bakteroid differenciációt figyeltek meg a Dalbergioid klád fajaiban is, úgy mint az *Aeschynomene* fajokban (Czernic és mtsai., 2015) és a földimogyoróban (*Arachis hypogaea*) is (Karmakar és mtsai., 2019; Raul és mtsai., 2022).



11. ábra Az NCR peptidek szerepe a *S. meliloti* baktériumfertőzés és bakteroid differenciáció szabályozásában *M. truncatula* gümősejtekben. (A) Vad típusú növényi sejtekben az NCR peptidek először az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenjébe kerülnek, miközben a szignál peptidáz-komplex (SPC) által levágódik a szignál peptidjük (SP). A SP levágása után az érett NCR peptidek a Golgi-készüléken keresztül transzportálódnak, majd a szekréciós úton eljutnak a szimbioszómákhoz, ahol a bakteroidok terminális differenciációját indukálják. A BacA fehérjét nem expresszáló $\Delta bacA$ mutáns baktériumok érzékenyek az NCR peptidekre, ezért elpusztulnak. (B) A *dnf1* mutáns sejtekben, a SPC hibája miatt az NCR peptidekről nem kerül levágásra a szignálpeptid, ezért azok az ER-ben halmozódnak fel, és nem jutnak el a szimbioszómákhoz. Ennek következtében a $\Delta bacA$ mutáns baktériumoknál nem megy végbe a terminális differenciáció (Az ábra forrása módosítva: Haag és mtsai., 2011 alapján).

1.9.2 Glicinben gazdag fehérjék (GRP-k) a növényekben

A glicinben gazdag fehérjék (GRP-k) a növényi sejtfal strukturális és funkcionális komponensei, amelyek számos élettani folyamatban játszanak szerepet. Ezek a fehérjék jellemzően magas glicintartalommal rendelkeznek, és gyakran tartalmaznak ismétlődő aminosav motívumokat, amelyek hozzájárulnak a sejtfal rugalmasságához és integritásához. A GRP-k részt vesznek a sejtfal szerkezetének kialakításában, a sejtek közötti kommunikációban, valamint a környezeti stresszhatásokkal szembeni válaszreakciókban, például a só- és szárazságtűrésben (Mangeon és mtsai., 2010).

A GRP-k egyes típusai, mint például a glicinben gazdag RNS-kötő fehérjék, poszt-transzkripciós szabályozóként működnek, befolyásolva az alternatív splicingot, az RNS szerkesztést és a transzkripció utáni szabályozást, ezáltal hozzájárulva a növényi fejlődés különböző szakaszaival, mint a csírázás, a gyökér- és virágfejlődés (Cheng és mtsai., 2023).

A GRP-k expressziója gyakran indukálódik különböző stresszhatások, például magas sókoncentráció vagy szárazság hatására, ami arra utal, hogy fontos szerepet játszanak a növények stresszválaszában és alkalmazkodási mechanizmusában. Egyes GRP-k, mint például a GhGRPL (Gh: *Gossypium hirsutum* - gyapot) gén által kódolt fehérje, elősegítik a másodlagos

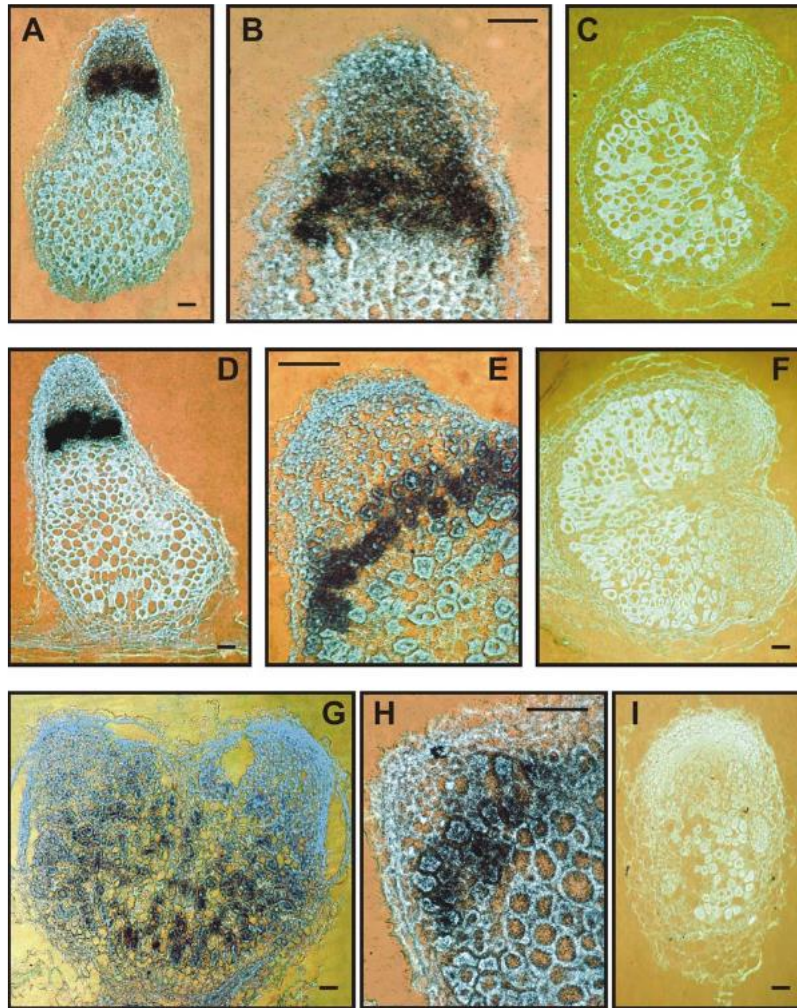
sejtfal kialakulását, ezáltal növelve a növények ellenálló képességét különböző abiotikus és biotikus stresszhatásokkal szemben (Yu és mtsai., 2024).

A GRP-k sokfélesége és funkcionális sokoldalúsága miatt ezek a fehérjék fontos kutatási célpontok a növényi biológia területén, különösen a növények stressztűrésének és fejlődési folyamatainak jobb megértése érdekében.

A következő alfejezetben a *nodGRP*-k, azaz a gümőspecifikus glicinben gazdag fehérjék szerepét tárgyaljuk.

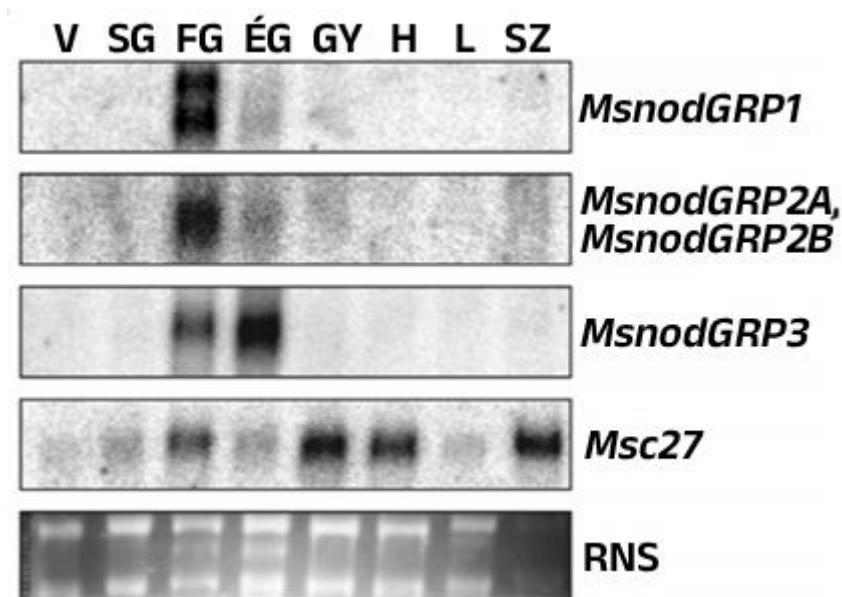
1.9.3 A *nodGRP* gének első jellemzése *M. sativa* fajban

Az első *nodGRP* peptideket *M. sativa* (lucerna) gyökérgümőiben írták le, ahol ezeknek a géneknek az expressziója kizárólag a gyökérgümőkre korlátozódott és szorosan kapcsolódott a *S. meliloti* baktériumfertőzéshez (Kevei és mtsai., 2002). Az *in situ* hibridizációs vizsgálatok eredményei szerint a *nodGRP1*, *nodGRP2* és *nodGRP3* gének különböző, jól definiált régiókban expresszáálódtak a gümő fejlődési zónáiban (12. ábra).



12. ábra A *MsnodGRP* transzkriptumok lokalizációja a *M. sativa* gümőkben *in situ* hibridizációval. Az A és B, *MsnodGRP1*, D és E, *MsnodGRP2*, valamint G és H, *MsnodGRP3* antiszensz ribopróbák hibridizációja. Hibridizáció a C, *MsnodGRP1*, F, *MsnodGRP2* és I, *MsnodGRP3* szensz ribopróbákkal. Az *MsnodGRP* gének expressziója kizárólag *M. sativa* gyökérgümőkben mutatható ki, *S. meliloti* fertőzés jelenlétében. Méretarány: 200 μ m. A ribopróbák 200 bp hosszú radioaktív kén izotópot (35 S) tartalmazó RNS molekulák (Kevei és mtsai., 2002).

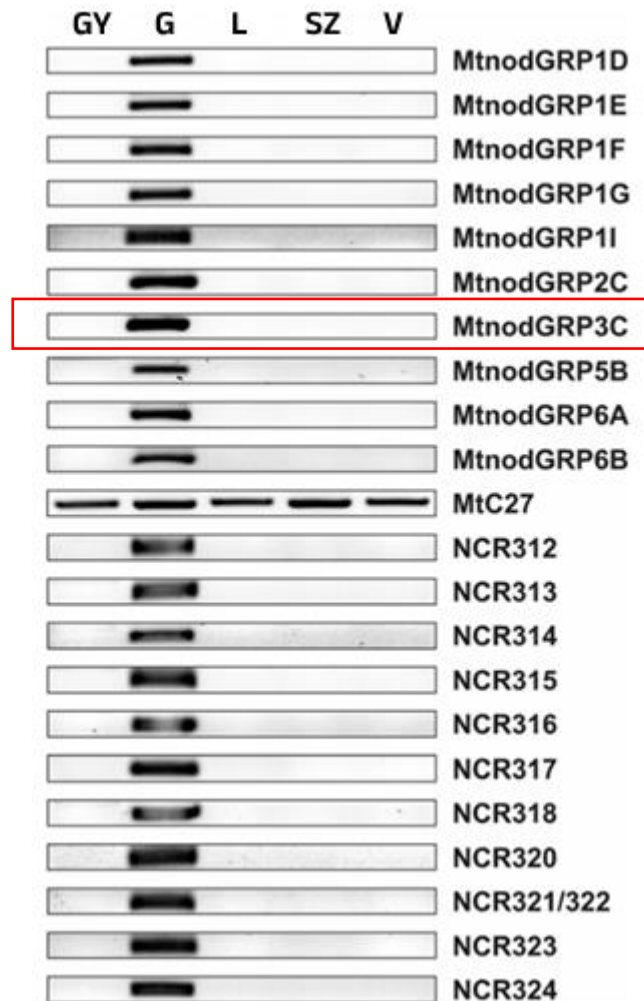
A Northern blot analízis alapján igazolódott, hogy ezeknek a peptideknek a génexpressziója kizárólag a fiatal és érett gümőkben mutatható ki, míg egyéb növényi szervekben nem detektálhatók (13. ábra; Kevei és mtsai., 2002). A *M. sativa nodGRP* géncsalád első vizsgálatai alapvető információkat nyújtottak a *nodGRP* peptidek gümőspecifikus funkciójáról.



13. ábra Northern blot analízis, mely megerősíti, hogy ezek a gének specifikusan a fiatal (YN) és érett (MN) gümőkben expresszálódnak. Kontrollként Msc27 gén expressziója és az RNS gél etídium-bromidos festése látható. Lucerna virágaiban (V), spontán gümőben (SG), fiatal gümőben 7 dpi-nél (FG), érett gümőben 21 dpi-nél (ÉG), gyökerekben (GY), hipokotilokban (H), levelekben (L) és szárakban (SZ), (Kevei és mtsai., 2002).

1.9.4 A *nodGRP* és NCR gének közös jellemzője a gümőspecifikus expresszió

A gümőspecifikus *nodGRP* és NCR géncsaládok multigenikus csoportokat alkotnak, melyek gyakran klaszterekben helyezkednek el a genom különböző régióiban. A *nodGRP* klaszterek génszerveződése alapján megfigyelhető, hogy a legtöbb *MtnodGRP* gén két exonból áll. Az első exon körülbelül 80 bázispárból áll, melynek nagy része a szignál peptidet kódolja, míg a második exon, melynek hossza 200–700 bp között van, a glicin-gazdag domént kódolja. Ez a szerkezeti felépítés adja az alapot a fehérjék működéséhez, mivel a szignál peptid funkciója a fehérje sejten belüli lokalizációjának meghatározása, míg a glicin-gazdag domén valószínűleg a fehérje funkcionális aktivitását adja. Az evolúciós elemzések során megfigyelték, hogy a *nodGRP* és NCR gének többszörös génduplikációs eseményeken mentek keresztül, melyek hozzájárultak a diverzifikációjukhoz, és lehetővé teszik a növények számára, hogy különböző, egymást átfedő szakaszokban eltérő peptidekkel irányítsák a gümőfejlődést (Alunni és mtsai., 2007; Downie és Kondorosi, 2021). Az RT-qPCR (reverz transzkripció polimeráz láncreakció, reverse transcription polymerase chain reaction) kísérletek igazolták ezen gének kizárólagos gümőspecifikus expresszióját (14. ábra), ami közvetlen kapcsolatra enged következtetni a szimbiotikus nitrogénkötő folyamattal (Alunni és mtsai., 2007).



14. ábra A *nodGRP* és NCR gének expressziós mintázata *M. truncatula* különböző szöveteiben reverse transcription-polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) meghatározva. Az RT-qPCR reakciókat olyan cDNS-sel végezték, amelyet gyökerekből (GY), gumókból (G), levelekből (L), szárakból (SZ) és virágokból (V) izoláltak. Az *NCR321* és *NCR322* gének esetében a primerek hasonló méretű ampikonokat eredményeztek mindkét génre, és a keletkezett termékek szekvenálása tette lehetővé azok megkülönböztetését. Minden esetben az *MtC27* amplifikációját használták pozitív kontrollként. Ábra forrása: Alunni és mtsai., 2007.

1.9.5 A *M. truncatula nodGRP* gének szekvenciális expressziója és a *nodGRP3C* gén kiválasztása

A *M. truncatula* teljes genom szekvenciája lehetővé tette a *nodGRP* géncsalád átfogó azonosítását. Az *M. truncatula nodGRP* gének hasonlóan gumóspecifikus expressziót mutatnak, mint a korábban vizsgált *M. sativa nodGRP* gének (Kevei és mtsai., 2002; Roux és mtsai., 2014).

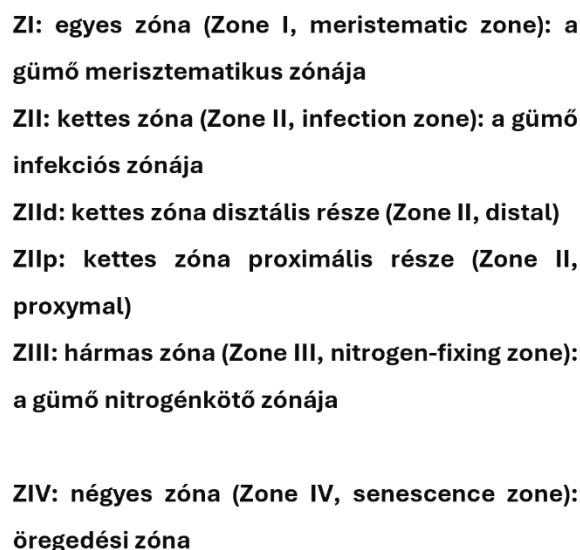
Az egyes *nodGRP* peptidek expressziója a gumó fejlődésének meghatározott zónáiban történik, specifikus mintázatot mutatva (1. táblázat). A génexpressziós adatok elemzése alapján a legtöbb *nodGRP* gén elsősorban az infekciós zóna proximális részében (ZIIp) és az interzónában (IZ) expresszálódik magasabb szinten (Roux és mtsai., 2014). A géncsalád egyes tagjai azonban

korai fejlődési stádiumban (ZI–ZII), mások később, az érett gümő nitrogénkötő zónájában (ZIII) mutatnak fokozott aktivitást.

<i>nodGRP</i>	aminosavak száma	pI	ZI	ZIIId	ZIIp	IZ	ZIII
NodGRP1A	148,00	9,37	6,00	17,90	54,50	20,20	1,40
NodGRP1C	121,00	7,98	0,00	0,40	41,60	56,00	2,00
NodGRP1D	79,00	9,60	1,10	72,80	25,70	0,30	0,10
NodGRP1E	108,00	7,08	6,00	17,90	54,50	20,20	1,40
NodGRP1F	189,00	9,12	0,30	16,20	77,90	5,50	0,00
NodGRP1G	86,00	9,94	0,30	16,20	77,90	5,50	0,00
NodGRP1H	109,00	4,12	0,10	13,40	81,70	4,80	0,00
NodGRP1I	192,00	4,57	1,30	24,70	58,70	14,80	0,40
NodGRP1J	89,00	6,94	0,10	2,40	31,80	39,10	26,70
NodGRP1K	142,00	7,05	0,00	0,70	33,00	37,60	28,70
NodGRP1L	92,00	5,03	0,00	0,00	2,30	78,90	18,80
NodGRP2A	87,00	4,96	0,00	2,30	65,80	27,60	4,30
NodGRP2B	95,00	8,92	0,00	0,30	60,90	38,60	0,20
NodGRP2C	113,00	9,30	0,00	0,30	60,90	38,60	0,20
NodGRP2D	76,00	9,06	0,00	0,50	27,90	42,70	28,80
NodGRP3A	204,00	4,90	0,10	0,40	5,40	48,60	45,40
NodGRP3B	112,00	5,59	0,00	0,10	0,60	61,40	37,80
NodGRP3C	98,00	10,40	8,50	13,90	60,10	17,30	0,30
NodGRP4	232,00	9,56	0,00	0,10	23,90	71,20	4,90
NodGRP5A	75,00	4,90	0,00	0,40	63,90	34,70	0,90

1. táblázat A *M. truncatula* *nodGRP* gének szekvenciális expressziós mintázata az egyes gümőzónákban (Roux és mtsai., 2014 adatai alapján). A piros színnel kiemelt peptidek, köztük a *nodGRP3C*, jelenleg kutatás alatt állnak csoportunkban, kiválasztásuk alapját elsősorban az eltérő expressziós mintázatuk adta.

A kutatócsoportunk jelenleg több *nodGRP* gén funkcionális vizsgálatát végzi, amelyeket a gümőfejlődési zónákban mutatott specifikus expressziós mintázatuk alapján választottunk ki. Ezen belül kiemelten tanulmányozzuk a *nodGRP3C* gént, amely a korai gümőfejlődés során, már az infekciós zónában (ZIIp) erősen, míg az interzónában alacsonyabb szinten fejeződik ki (1. táblázat; 15. ábra; Roux és mtsai., 2014) és emellett ennek a *nodGRP*-nek a legmagasabb az izoelektromos pontja (pI).



1.9.6 Gümőspecifikus glicin-gazdag fehérjék (*nodGRP*) szerkezete

A *nodGRP* peptidek szintén a szimbiotikus sejtekben expresszálódnak, szerkezetükre jellemző, hogy egy N-terminális szignálpeptidből és egy körülbelül 100-200 aminosavból álló glicinben gazdag érett polipeptidláncból épülnek fel (16. ábra). Az érett fehérjék glicintartalma kiemelkedően magas, elérheti a teljes aminosav-összetétel 30-40%-át, emellett jelentős mennyiségű lizin (10-15%) is megtalálható bennük (Kevei és mtsai., 2002; Alunni és mtsai., 2007). Összesen legalább 34 peptidet azonosítottak eddig ebben a családban. Génexpressziójuk szigorúan szabályozott, térben és időben is specifikus mintázatot mutat a fejlődő gyökérgümőkben. Bár pontos funkciójuk még nem teljesen ismert, feltételezések szerint a *nodGRP* peptidek részt vesznek a baktérium-növény interakciók szabályozásában, membráninterakció révén elősegíthetik a bakteroidok megfelelő differenciációját és működését (Kevei és mtsai., 2002; Alunni és mtsai., 2007). A *nodGRP* peptidek szabályozási hálózatának további vizsgálata kulcsfontosságú lehet a gümőspecifikus gének expressziójának és a bakteroid differenciáció pontos mechanizmusainak megértéséhez.

GLICINBEN GAZDAG FEHÉRJÉK



16. ábra A gümőspezifikus glicinben gazdag nodGRP peptidek szerkezeti jellemzői. A peptidek egy rövid, N-terminális szignálpeptiddel rendelkeznek, amely a szekréció során lehasad. Az érett, glicinben gazdag polipeptid régióban (100–200 aminosav) a glicin (G) tartalom eléri a 30–40%-ot, emellett a lizin (K) is jelentős mértékben (10–15%) jelen van (Kevei és mtsai., 2002; Alunni és mtsai., 2007 alapján, módosítva).

A *nodGRP3C* gén által kódolt peptid egy rövid, 98 aminosavból álló fehérje, amely egy szignál peptidet és egy érett, funkcionális domént tartalmaz. A szignál peptid a fehérje szekréciós útvonalra irányításáért felelős, míg az érett peptidrész főleg glicinben gazdag aminosav szekvenciákból áll, amelyek fontosak lehetnek a fehérje biológiai aktivitásában. A *nodGRP3C* peptid erősen kationos tulajdonságokkal rendelkezik, izoelektromos pontja (pI) 10,40, ami arra utal, hogy pozitív töltésű fiziológias pH-nál.

1.10 A gümő szeneszenciája: az öregedési folyamat molekuláris szabályozása

A gümőszeneszencia nemcsak az életkor előrehaladtával járó természetes öregedési folyamat eredménye, hanem különböző környezeti stresszhatások, például vízhiány (Gogorcena és mtsai., 1995; González és mtsai., 1998), magas nitrátkoncentráció (Lorenzo és mtsai., 1990; Swaraj és mtsai., 1993; Escuredo és mtsai., 1996; Matamoros és mtsai., 1999), elhúzódó sötétség (Gogorcena és mtsai., 1997; Matamoros és mtsai., 1999; Pérez Guerra és mtsai., 2010), illetve foszfinotricin-expozíció (Seabra és mtsai., 2012) is előidézhetik. Ezek a tényezők mind felgyorsíthatják a gümő sejtes struktúráinak lebomlását, amely során stressz- és védekezési gének expressziója fokozódik (Van de Velde és mtsai., 2006).

Nemcsak környezeti, hanem genetikai tényezők is kiválthatnak idő előtti gümőszeneszenciát. Az elmúlt években több kutatás is kimutatta, hogy a *M. truncatula* Fix⁻ mutánsainak (pl. *dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TR36, TRV36) gümőiben már korán – akár két héttel az inokuláció után – elindulnak a lebomlási folyamatok, melyeket gyors génexpressziós változások, morfológiai és funkcionális eltérések kísérnek (Maunoury és mtsai., 2010; Horváth és mtsai., 2015; Kim és mtsai., 2015; Horváth és mtsai., 2023).

Ezekre a mutánsokra jellemző, hogy:

- a nitrogénkötéshez szükséges gének (például *nifH*) expressziója gyorsan csökken,
- a bakteroidok és a szimbiotikus sejtek korán degenerálódnak,
- a gümő struktúráját szaprofita rhizobiumok visszafoglalhatják,
- a szimbiotikus sejtek posztmitotikus differenciációja gátolt,
- a szeneszencia marker gének (*CP2*, *CP6*, *chitinase 2*, *PAP22*) expressziója fokozódik.

Mindemellett ezekben a gümőkben nem növekedik sem a szimbiotikus kapcsolat fenntartásban szerepet játszó gének (*DNF2*, *SymCRK*, *RSD*), sem a klasszikus védekezési markergén

(*PR10.1*) expressziója, ami azt sugallja, hogy a korai szeneszencia főként proteolitikus folyamatok által irányított, nem pedig immunválasz által kiváltott (Berrabah és mtsai., 2023; Berrabah és mtsai., 2024).

A fenti mutánsok elemzéséből kirajzolódik, hogy a gyors gümőszeneszencia közös jellemzője lehet az ineffektív *Medicago–Sinorhizobium* szimbiotikus kapcsolatoknak, függetlenül attól, hogy pontosan melyik gén hibásodott meg. Ezt a koncepciót Maunoury és munkatársai (2010) vezették be, amikor 15 különböző növényi és bakteriális Fix⁻ mutánsvonalat hasonlítottak össze. Megállapították, hogy a legtöbb növényi Fix⁻ mutáns az első kategóriába esett, ahol a gümők hosszúkás, Y-alakú, differenciált bakteroidokat tartalmaztak, és két fő hullámban zajlottak a transzkripciós változások, amelyek nagyon hasonlítottak a vad típusú növények gümőiben tapasztalt mintázatokhoz, ám a szeneszencia már nagyon korán, akár két héttel a fertőzés után elindult.

A TR36 és TRV36 fenotípus genetikai háttere jelenleg még nem tisztázott, a TR183 fenotípus viszont az *NCR-new35* gén működésének elvesztéséhez köthető (Horváth és mtsai., 2023). Hasonló, idő előtt öregedő, nem-funkcionális gümőket figyeltek meg a *dnf4* (*NCR211* deléción; (Kim és mtsai., 2015) és a *dnf7-2* (*NCR169* deléción; Horváth és mtsai., 2015) mutánsokban is. Ezek az NCR gének egymást követő fejlődési szakaszokban aktiválódnak: az *NCR-new35* a II. zónában, az *NCR211* az interzónában és a fiatal nitrogénkötő sejtekben (III. zóna), míg az *NCR169* az interzónától kezdve a teljes ZIII-ban expresszálódik.

A rhizobiumok gümőn belüli túléléséhez elengedhetetlen a növény szimbiotikus génjeinek összehangolt működése, például a *DNF2* (defective in nitrogen fixation), a *SymCRK* (symbiotic cysteine-rich receptor-like kinase) és az *RSD* (regulator of symbiosome differentiation) géneké (Bourcy és mtsai., 2013; Sinharoy és mtsai., 2013; Berrabah és mtsai., 2014). Ezek a gének egy foszfatidil-függő foszfolipáz C-szerű fehérjét, egy ciszteinben gazdag receptor kinázt és egy C2H2 transzkripciós faktort kódolnak, és mutációjuk nem-funkcionális gümőket eredményez, amelyeket erősödő növényi védekezés (fenolos anyagok felszaporodása, patogénválasz-gének indukciója) és differenciálatlan bakteroidok pusztulása jellemez. Ez azt mutatja, hogy a gümőszeneszencia és az immunválasz kapcsolata *Medicago* gümőkben sokkal komplexebb, mint korábban gondoltuk (Berrabah és mtsai., 2023; Berrabah és mtsai., 2024).

Összességében az idő előtti szeneszencia, amely különböző genetikai hibákból ered, nem csak egyes mutációk sajátossága, hanem általános mintázatnak tűnik a hatástalan pillangósvirágú–rhizobium szimbiózisokban. Ennek alátámasztására a saját vizsgálatainkban öt különböző, nitrogénkötésre képtelen Fix⁻ *M. truncatula* mutánsvonal szeneszenciájának lefolyását elemeztük, amelyek közül háromban ismert NCR génhiba (*dnf4*: *NCR211*, *dnf7-2*: *NCR169*,

TR183: *NCR-new35*), kettőben pedig ismeretlen mutáció található (TR36, TRV36). Minden vizsgált mutánsnál hasonló, idő előtti szeneszencia-jellemzőket találtunk, kisebb különbségekkel a folyamat időbeli lefolyásában, ami megerősíti, hogy a korai gümőszeneszencia a nem-funkcionális *Medicago–Sinorhizobium* kapcsolatok közös kimenetele.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásom központi célkitűzése a szimbiotikus nitrogénkötés zavarára adott növényi válaszreakciók, különösen a korai gümőszeneszencia folyamatának vizsgálata. Fő kérdésünk az volt, hogy a különböző genetikai háttérű *Fix⁻ M. truncatula* mutánsok hasonló szeneszencia-változásokat mutatnak-e?

Az alábbi kutatási kérdések vizsgálatát tűztem ki célul:

1. Milyen közös sejtes és molekuláris jellemzők figyelhetők meg különböző *Fix⁻ M. truncatula* mutánsok korai gümőszeneszenciája során?
A cél az volt, hogy részletesen feltárjuk azokat a konzisztens vonásokat – például a *nifH* expresszió korai lecsökkenése, bakteroid-degradáció, endodermisz záródása, szeneszencia marker gének aktivációja – amelyek különböző génhibák mellett is közös mintázatot mutatnak a gümőkben.
2. Kivált-e a *nodGRP3C* gén expressziójának változása hasonló szeneszencia-folyamatokat, mint amiket a *Fix⁻* mutánsok esetében megfigyeltünk?
A transzgenikus *nodGRP3C* antiszensz, RNAi és overexpresszáló vonalak elemzésével arra kerestem választ, hogy e gén működése mennyiben befolyásolja a gümők fejlődését, működését és életciklusát, és hogy a kialakuló eltérések hasonlóságot mutatnak-e a *Fix⁻* mutánsok szeneszencia jellemzőivel.
3. Általánosítható-e a korai gümőszeneszencia mint válasz a szimbiotikus működés zavaraira?
A különböző genetikai eredetű mutációk összehasonlító elemzésével célom volt annak megértése, hogy a szeneszencia mintázatai mennyire tekinthetők univerzális válasznak a hatástalan szimbiózisra, vagy specifikusan a génekhez köthetők.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Klónozás / Vektorok létrehozása

A *nodGRP3C* antiszensz (*nodGRP3C* AS) növényeket a CaMV 35S promóterrel kifejeztett fordított irányú *nodGRP3C* (*Medtr2g069245*) kódoló szekvenciával csendesítettük el, azáltal, hogy a transzgenikus és natív *nodGRP3C* mRNS nukleotidjai bázispárosodás során duplaszálú RNS-t alkotnak, melyet felismer a növény endogén RNS-interferencia rendszere és a DICER enzim révén elvágja a vele komplementer mRNS szekvenciákat.

Az RNAi konstrukcióknál a vektor önmagában létrehozza a duplaszálú RNS mindkét szálát. A *nodGRP3C* kódoló szakaszának 279 bp-jét (a teljes második exont) 5-3' és 3'-5' irányban is a *L. japonicus* ubiquitin 1 promóter (*LjUBQ10*) vezérlése alá helyeztük, amely minden sejttípusban aktív. A konstrukciót a foszfinotricin (PPT/BASTA) rezisztenciát biztosító pCAMBIA3301 vektorba helyeztük. Az RNAi vonalak létrehozására azért volt szükség, mivel az AS vonalból csak két növény állt rendelkezésünkre, melyeknek nem maradt fenn életképes utóda.

A *nodGRP3C* túltermelő vektor nagyban hasonlít az RNAi vektorhoz, csak itt a teljes kódoló szakaszt (szignál peptiddel együtt) fejezi ki a *LjUBQ10* promóter a pCAMBIA3301 vektorban. A *M. truncatula* (R108) növények stabil transzformálását *A. tumefaciens* közvetítésével végeztük a standard levélkorong-módszer módosított protokollja alapján (Hoffmann és mtsai., 1997; Crane és mtsai., 2006; Cosson és mtsai., 2006), PPT szelektáló táptalaj alkalmazásával.

3.2 Növényi anyag és növekedési körülmények

Kísérleteinkben *M. truncatula* különböző ökotípusait és mutáns vonalait alkalmaztuk. Vad típusú kontrollként az A17, Jemalong 5 és R108 genotípusokat használtuk. A Fix⁻ mutánsok közül a *dnf4* és *dnf7-2* vonalakat gyors neutron-besugárzással hozták létre A17 növényekből (Starker és mtsai., 2006; Horváth és mtsai., 2015; Kim és mtsai., 2015), míg a TR36, TRV36 és TR183 mutánsokat γ -sugárkezeléssel állították elő Jemalong 5 növényekből (Sagan és mtsai., 1995; Morandi és mtsai., 2005; Maunoury és mtsai., 2010; Horváth és mtsai., 2023). Stabil transzformáns vonalak létrehozására leginkább az R108 ökotípus az alkalmas (Wen és mtsai., 2019).

3.2.1 A magok csíráztatása

A *M. truncatula* magok felszínének megsértését és a fertőtlenítését 96%-os tömény kénsavban 4 percig történő áztatással értük el, majd a kénsav eltávolítása után, hideg steril desztillált vízzel

többször átmottuk. A sterilizált magokat 0,8% agart tartalmazó lemezen csíráztattuk 1 napig hűtőszekrényben (4°C, sötétben) majd ezt követően 2-3 napig szobahőmérsékleten (24–26 °C, sötétben).

3.2.2 A növények nevelése

A növényeket hosszúnappalos fényviszonyok mellett (16 óra megvilágítás/ 8 óra sötét) neveltük, 25 °C-on, üvegházi körülmények között. A kísérleteket sterilizált zeolitban végeztük, a *M. truncatula* Handbook ajánlásai alapján (<https://www.noble.org/medicago-handbook/>). A tápoldat alacsony nitrogéntartalmú Fahreus (0,7 mM KH₂PO₄, 0,8 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM MgSO₄, 0,9 mM CaCl₂, 20 µM vas-citrát, pH 7,4, autokláv után: 1,6 µM H₃BO₃, 0,6 µM CuSO₄, 0,5 µM NaMoO₄, 0,6 µM ZnSO₄, 0,6 µM MnSO₄) volt, és kétnaponta öntöztük úgy, hogy a nedvességtartalom megfelelő legyen a növények fejlődéséhez. Az EdU (5-etinil-2'-deoxiuridin) inkorporációs kísérletekhez a csírákat etilén-bioszintézis inhibitorral, -1 mM aminoetoxi-vinil-glicinnel (AVG)- kiegészített, pH 6,5-re beállított BNM (Buffered Nodulation Medium, összetevők 1 literben, pH 6.5: CaSO₄ · 2H₂O: 344 mg, MES · H₂O: 390 mg, NaFe-EDTA: 18,35 mg, ZnSO₄ · 7H₂O: 4,6 mg, H₃BO₃: 3,1 mg, MnSO₄ · H₂O: 8,45 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O: 250 mg, CuSO₄: 16 mg, CoCl₂ · 6H₂O: 25 mg, MgSO₄ · 7H₂O: 122 mg, KH₂PO₄: 68 mg, Kalys agar: 11,4 g) táptalajon neveltük enyhén megdöntött, függőlegeshez közeli helyzetben, steril körülmények között (Ehrhardt és mtsai., 1992).

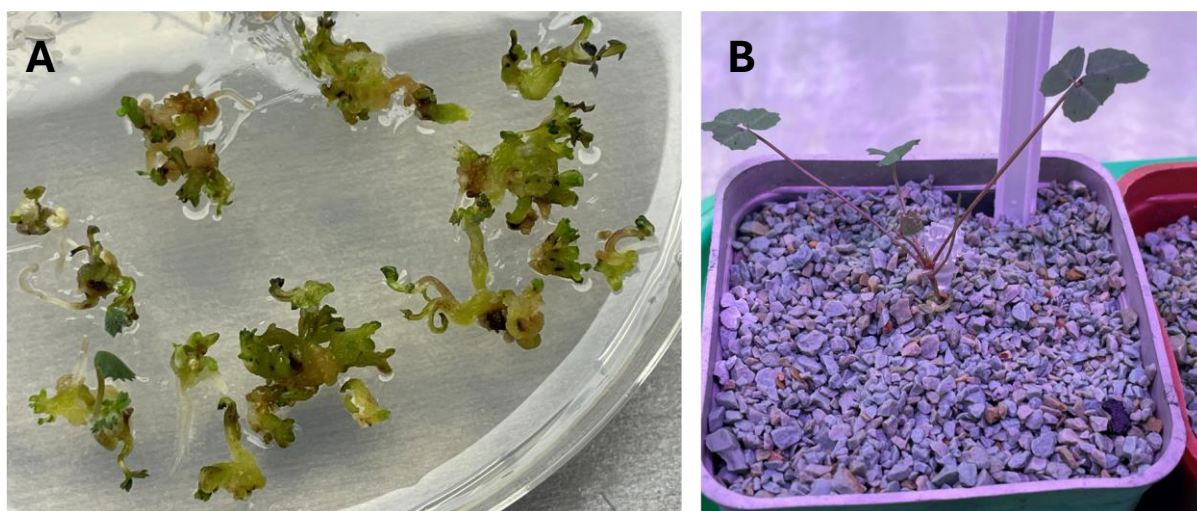
3.3 Bakteriális törzsek és inokuláció

A Jemalong 5 és A17 vonalakhoz a *Sinorhizobium medicae* WSM419, míg az R108 vad típusú háttérből származó mutánsokhoz a *Sinorhizobium meliloti* Rm41 baktériumtörzset alkalmaztuk. Mindkét baktériumtörzset TA tápközegben (összetevők 1 literben: 10 g tripton, 1 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 15 g agar) növesztettük 30 °C-on 48 órán keresztül. A növényeket ezt követően OD₆₀₀ = 0,6–0,8 sűrűségű (megközelítőleg 6–8 × 10⁸ sejt/ml) kultúrával fertőztük, amelyet alacsony nitrogéntartalmú Fahreus-oldatban szuszpendáltunk. Az inokulumot steril zeolit felszínére vittük fel, 1–2 mL mennyiségben csíránként.

3.4 Stabil transzformáns növények előállítás

A kísérlet elején *A. tumefaciens* EHA105 törzs oldatában áztattuk a steril R108 levéldarabokat, majd a regeneráció során a kialakuló kallusz-szöveteket BASTA tartalmú táptalajon

szelektáltuk (Hoffmann és mtsai., 1997; Crane és mtsai., 2006; Cosson és mtsai., 2015). Ebben a rendszerben a konstrukcióba épített *bar* gén biztosít rezisztenciát a foszfinotricinnel szemben, így kizárólag a transzgenikus hajtások voltak képesek tovább fejlődni (17. A ábra). A hajtásokból *in vitro* körülmények között neveltünk teljes növényeket (T0-nemzedék), amelyek gyökeresítés után zeolitba (17. B ábra), majd földbe ültetve fejlődtek, és magot hoztak. A transzgén jelenlétét PCR-rel validáltuk *LjUBQ10* promóter-specifikus primerekkel (2. függelék), és RT-qPCR-elemzésekkel (primerek: 2. függelék) igazoltuk a géncsendesítés mértékét. A T1 és T2 generációkkal végeztük a fenotípusos és molekuláris vizsgálatokat.



17. ábra Stabil transzformáns *M. truncatula* (R108) növények előállítása *nodGRP3C* OE konstrukcióval. R108 növények levélszövegeiből kialakuló kalluszok és regenerálódó hajtások *in vitro* körülmények között (A), stabil transzformáns növények fejlődése és növekedése zeolitban üvegházi körülmények között (B).

3.5 Mikroszkópos vizsgálatok

Időpontonként és biológiai ismétlésenként 4–5 növényről származó 7–8 gümőt gyűjtöttünk. A gümőket a fertőzést követően, megadott napokon (7, 8, 10, 15, 17, 21 dpi) gyűjtöttük be.

Bakteroid izolálás:

Az izolált bakteroidpopuláció méreteloszlásának meghatározásához a gümőket folyékony nitrogénben fagyasztottuk, finom porrá őröltük, majd 1×PBS-ben (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ / liter, pH 7,4) szuszpendáltuk (Starker és mtsai., 2006; Kim és mtsai., 2015). A gümőmaradványokat rövid centrifugálással (100 g, 5 perc) távolítottuk el. A tisztított felülúszót CellTrics® szűrőn (10 µm hálóméret, Sysmex Partec) szűrtük át. A baktériumokat centrifugálással (4400 g, 10 perc) üleptítettük.

Konfokális mikroszkópos vizsgálathoz a felforralt bakteroidokat 30 μM végső koncentrációjú propidium-jodiddal (PI) festettük 5 percig. A bakteroidok méretét és morfológiáját konfokális mikroszkópos képeken elemeztük (Olympus FV10-ASW 4.0 szoftverrel). Átlagosan 200-300 bakteroid hosszmerését végeztük időpontonként, genotípusonként (ImageJ).

Az élő/elhalt bakteroidok festését friss gümömszeteken, PBS-ben (pH 7,4) végeztük, 5 μM Syto 9 és 30 μM PI (LIVE/DEAD BacLight Viability Kit, Life Technologies) hozzáadásával, 20 percig, szobahőmérsékleten. A Syto9 a membránon átjutó, nukleinsavhoz kötődő, zöld fluoreszcenciájú festék (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 500–530 nm), míg a PI a sérült membránú vagy elhalt sejtekben és az átalakult bakteroidok membránján átjutva piros fluoreszcenciát ad (gerjesztés: 543–561 nm, emisszió: 590–630 nm). A metszeteket ultratiszta vízzel öblítettük, majd Olympus Fluoview FV1000 (Olympus) vagy Leica SP5 (Leica) konfokális lézerpásztaó mikroszkóppal vizsgáltuk. Az endodermisz kék autofluoreszcenciáját UV-fényben (gerjesztés: 405 nm, emisszió: 430–480 nm) rögzítettük.

Az izolált bakteroidok hosszát (vonalanként és időpontonként 10 kép, három független kísérletből, ~500–1000 sejt) a mikroszkóp saját szoftverével (Olympus FV10-ASW 4.0 verzió) mértük, a fő tengely mentén a két sejtvégpontot összekötő egyenes hosszának meghatározásával.

Hisztokémiai GUS-festést formaldehiddel fixált gümőkön végeztünk (Horváth és mtsai., 2015). A GUS-riporter gént hordozó *S. medicae* WSM419 fertőzések esetén a *nifH* promóter aktivitását GUS-festéssel tettük láthatóvá. A gümöket átmostuk PBS-sel, majd 2 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid) oldatban inkubáltuk 37 °C-on 2–4 órán keresztül. A kék csapadék megjelenése a *nifH* promóter működését jelzi. A mintákat agarózba ágyasztuk (5%), ezután 70–100 μm vastag metszeteket készítettünk mikrotómmal (MICROM HM 650 V), és fénymikroszkópos (Zeiss Axioskop 40) felvételeket készítettünk. A GUS-riporter aktivitásának meghatározásához az ImageJ program szabadkézi kijelölő eszközével (Schindelin és mtsai., 2012) mértük meg a kék színű festést mutató területeket. A GUS-pozitív és a teljes gümőterületet külön-külön határoztuk meg, majd a relatív jelintenzitást a GUS-festett terület és a teljes gümőterület hányadosaként fejeztük ki. Az értékeket minden időpontban (dpi) a megfelelő vad típusú kontrollhoz viszonyítva normalizáltuk.

3.5.1 EdU-jelölés (S-fázis detektálása)

A növények gyökérrendszerét teljesen bemerítettük 10 mL folyékony BNM-tápoldatba, amely 30 μ M EdU-t (5-ethynil-2'-deoxiuridin) tartalmazott, és 50 mL-es polipropilén kémcsövekben helyeztük el. Az EdU-jelölést 15 órán át végeztük, majd a mintákat frissen készített, 4%-os paraformaldehidet és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben fixáltuk, 1 órán keresztül. Az Alexa 488 azid-alapú EdU-kimutatást és a konfokális mikroszkópos vizsgálatra való mintaelőkészítést Vanstraelen és mtsai., 2009; Kotogány és mtsai., 2010 módszere szerint végeztük. Röviden: a gumókat és ~0,5 cm hosszú gyökércsúcsokat 96 lyukú mikrotiter lemezekbe helyeztük, PBS-ben. A gyökércsúcsokat pozitív kontrollként is használtuk az EdU-jelölés és kimutatás során. A PBS-t minden lyukban frissen készített EdU-detektáló koktéllal (a gyártó utasításai szerint készítve) helyettesítettük, majd 200 rpm-en, sötétben ráztuk 1 órán keresztül. Ezt követően a koktélt 1 μ g/mL DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenilindol) tartalmazó PBS-re cseréltük, és 1 órán át inkubáltuk. A mintákat egyszer PBS-ben mostuk 15 percig, majd Fluoromount-G antifade oldattal (Southern Biotechnology Assoc., Birmingham, AL, USA) ágyasztuk be. Az EdU-pozitív sejtmagok számát kézzel határoztuk meg az ImageJ szoftver (Schindelin és mtsai., 2012) többpontos kijelölő eszközével számoltuk meg. A konfokális képek maximális intenzitásprojekcióit elemeztük, és minden egyes EdU-jelölt sejtmagot egymás utáni kattintásokkal jelöltünk meg, ami automatikusan létrehozta és a képernyőn megjelenítette az összesített darabszámot.

3.5.2 Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A gyökérgumók fixálása 2,5%-os glutáraldehiddel (Sigma-Aldrich) történt PBS-ben, 4 °C-on, egy éjszakán át. A fixálást követően a mintákat desztillált vízzel mostuk 15 percig, majd 2%-os ozmiumsav-oldattal (Sigma-Aldrich) kezeltük 1 órán keresztül (Millonig, 1961). Ezután újabb desztillált vizes öblítés (10 perc) következett, majd a minták fokozatosan emelkedő koncentrációjú etanol sorozattal (50%, 70%, 90%, 96%, 100%, 100%; mindegyik lépésben 10 percig) lettek víztelenítve. Az etanolos kezelés után a mintákat 1,2-propilén-oxiddal (Millipore, Burlington, MA, USA) kezeltük 5 percig, majd Durcupan ACM (Sigma-Aldrich) epoxigyantába ágyasztuk őket. A gyanta impregnálásához propilén-oxid és epoxigyanta különböző arányú keverékét használtuk (3:1, 1:1, 1:3; mindegyik arányban 1 órán át). Ezt követően tiszta gyantába helyeztük a mintákat kétszer 1 órára, majd szobahőmérsékleten tiszta gyantában hagytuk őket egy éjszakán át. A gyantablokkok polimerizációja 56 °C-on, 48 órán keresztül történt.

Az így elkészített gyantablokkokból ultramikrotom segítségével (Ultracut UCT, Leica; Wetzlar, Németország) 50 nm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket formvarral bevont rézrácsokra helyeztünk (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). A metszetek kontrasztosítása 2%-os uranil-acetát-oldattal (Electron Microscopy Sciences; 2% oldat 50%-os etanolban) és 2%-os ólom-citráttal (Electron Microscopy Sciences; 2% oldat desztillált vízben) történt (Reynolds, 1963). Az ultramikroszkópos vizsgálatokat JEM-1400Flash transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL; Tokyo, Japán) végeztük. A metszetek alacsony nagyítású (500–2000×) szisztematikus áttekintése után a szimbiotikus sejtek kiválasztását követően 16 bites szürkeárnyaltos képeket rögzítettünk 800–10000× műszeres nagyítással, Matataki Flash sCMOS kamerával (JEOL).

3.5.3 Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

A 0,1 µm pórusátmérőjű polikarbonát membránra (Merck) 10 µl 0,01%-os poly-L-lizint cseppentettünk, majd 5 µl bakteroid izolátumot szárítottunk rá. Ezután legalább egy órán át vagy egy teljes éjszakán át, 4 °C-on, 2,5%-os glutáraldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk. Majd fokozatosan emelkedő koncentrációjú etanol sorozatban (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% és végül többször cserélt 100%) dehidratáltuk a mintákat, mindegyik lépésben legalább 1 óra időtartammal. A minták eredeti szerkezetének megőrzése érdekében kritikus-pont szárítást alkalmaztunk (K850; Quorum Technologies Ltd). Szárítás után a mintákat 10–15 nm vastag aranyréteggel vontuk be Quorum Q150T ES (Quorum Technologies, Lewes, UK) katódporlasztó segítségével. A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokat JEOL JSM-7100F/LV típusú készüléken végeztük, amely termikusan segített téremissziót (T-FEG) használ a nagy felbontás elérésére, továbbá lehetővé teszi a magas és alacsony vákuumban történő méréseket is.

3.6 Génexpressziós analízis (RT-qPCR)

Vonalanként és időpontonként, biológiai ismétlésenként 6–8 növényről származó, összesen 20–30 gümőt gyűjtöttünk be a fertőzést követő 7., 11. és 15. napon (dpi), majd azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A teljes RNS-t a ZR Plant RNA MiniPrep készlettel (Zymo Research) izoláltuk.

A cDNS szintézishez 1 µg teljes RNS-t használtunk, amelyet 20 µL reakciótérfogóban írtunk vissza a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems). Az RT-qPCR méréseket StepOne Plus készüléken (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint.

A ciklusküszöbértékeket (Ct) meghatároztuk, majd az adatokat a StepOne szoftver v2.3 segítségével elemeztük. A relatív expressziós szinteket a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel számoltuk ki, a 40S riboszomális fehérje S19 génjét referenciagénként használva (Nagymihály, 2017). A vizsgálatban alkalmazott primerek listáját a 2. függelék tartalmazza.

3.7 Transzkriptomikai elemzés

A transzkriptomikai kísérletekhez zeolitban neveltük a vad típusú R108 (kontroll) és az R108 genetikai hátterű, *nodGRP3C* AS és OE konstrukciót hordozó növényeket, majd *S. meliloti* Rm41 baktériummal fertőztük. A fertőzés után 8 nappal gyűjtöttük be a gumókat, majd a mintákat azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben. Az RNS izolálására a Quick-RNA Plant Miniprep (Zymo Research) kitet használtuk, az esetleges DNS-szennyeződéseket DNáz kezeléssel távolítottuk el. Az RNS-ek mennyiségi és minőségi paramétereit Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies) készülékkel ellenőriztük. Az RNA-seq-hez kilenc mintát készítettünk (3x control, 3x *nodGRP3C* OE, 3x *nodGRP3C* RNAi, 8 dpi). A minták több egyedből poolozott gumó RNS-ek voltak; a poolok és forrásazonosítók részleteit az 5. függelék tartalmazza. Ezt követően továbbítottuk szekvenálásra a Novogene cégnek, ahol transzkripció elemzést végeztek (lásd: 6. függelék).

Az adatok elemzéséhez a nyers szekvenálási leolvasásokat a Trim Galore eszközzel vágtuk meg (v0.6.10, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). A tisztított leolvasásokat a *M. truncatula* (MtrunA17r5.0-ANR) és a *S. meliloti* (ASM696v1) referencia szekvenciákhoz illesztettük a Salmon (v1.10.3) programmal (Patro és mtsai., 2017), 10 bootstrap futással és az *validate Mapping* opció bekapcsolásával. A mennyiségi adatok átalakítását a wasabi eszközzel (v1.0.1) végeztük, majd statisztikai elemzést a Sleuth (v0.30.1) programmal hajtottunk végre (Pimentel és mtsai., 2017). A nyers olvasási számokból TMM-FPKM normalizált expressziós értékeket számítottunk az edgeR program segítségével (v4.4.0, Robinson és mtsai., 2010). A feltételek közötti differenciális génexpresszió-elemzést a DESeq2 (v1.46.0) segítségével végeztük (Love és mtsai., 2014). A vizsgált gének expresszióját hő térképeken ábrázoltuk a ComplexHeatmap (v2.22.0, Gu és mtsai., 2016) és az R program (v4.4.2) környezetében.

3.8 Áramlási citometria (Flow cytometry)

A gumókban zajló endoreduplikáció mértékének becsléséhez a sejtmagi DNS-tartalmat mértük áramlási citometriával. 7, 11 és 15 dpi gumókat jég hideg, 45 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, 30 mM nátrium-citrát, 0,1% Triton X-100 (pH 7,0) összetételű oldatban „chopping” (pengével

darabolás) módszerrel szétaraboltuk (Galbraith és mtsai., 1983). Az izolált sejtmagokat 30 µm-es nylon szűrőn szűrtük át, majd 10 µM propídium-jodiddal (PI) festettük. A sejtmagok DNS-tartalmát Beckman MoFlow Astrios citométerrel (Beckman Coulter) elemeztük. A 2C, 4C, 8C, 16C, 32C, 64C csúcsok arányából következtettünk az endociklusokra.

3.9 Fehérjekivonás és Western blot

A gümőkől a megadott időpontokban összegyűjtött mintákból teljes oldható fehérjeextraktumot készítettünk, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 és proteázgátló koktél (Complete, Merck Millipore) tartalmú pufferben.

A tisztított minták fehérjekoncentrációját a Pierce Detergent Compatible Bradford Assay Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg. A fehérjéket 12%-os SDS–poliakrilamid gélen választottuk szét, majd PVDF membránra (Immobilon-P, Merck Millipore) blottoltuk, és anti-leghemoglobin poliklonális ellenanyaggal inkubáltuk. A Ponceau S festés loading kontrollként szolgált, bizonyítva, hogy minden mintából hasonló mennyiséget vittünk fel a gélre és így a különbségek valósak.

Az anti-leghemoglobin (*M. sativa Lb3*) ellenanyagot — Dr. Carroll P. Vance-től (University of Minnesota USDA ARS) kapott ajándékként (Wycoff, 1998; Cordoba és mtsai., 2003)— 1:1000 arányban hígítva használtuk. Másodlagos ellenanyagként kecske anti-nyúl IgG (H + L)-HRP konjugátumot (#1706515, Bio-Rad Laboratories) alkalmaztunk.

3.10 Felhasznált programok

Szekvenciaillesztés:

A genomi régiók illesztését, és a konstrukciók megtervezését a Clone Manager (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA) és a Vector NTI programokkal végeztük.

Szignálpeptid (SP) régiók meghatározása:

A SP-ek azonosítására a SignalP 5.0 (Almagro Armenteros és mtsai., 2019) programot használtuk.

Képszerkesztés:

A mikroszkópos felvételek utólagos szerkesztését és a mennyiségi kiértékeléseket az ImageJ version 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) programmal végeztük.

Ábrák és diagramok készítése:

A különböző grafikonok és diagramok elkészítéséhez és a statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism version 10 (San Diego, California USA, www.graphpad.com) szoftvert használtuk.

Irodalmi hivatkozások kezelése:

A szakirodalmi hivatkozások gyűjtésére, rendszerezésére és formázására a Zotero 6.0. (Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University, Fairfax, VA, USA, <https://www.zotero.org/>) programot használtuk, amely integrálható a word szövegszerkesztővel.

3.11 Adatkiértékelés és statisztika

A mennyiségi eredményeket legalább három, egymástól független biológiai ismétlésből nyertük, minden esetben három technikai párhuzamossal. A két csoport közötti összehasonlítást általában páros t-próbával végeztük. Több csoportos összehasonlítás esetén ANOVA (Tukey vagy Dunnett post hoc teszt) módszert alkalmaztunk. Az adatfeldolgozás és a statisztikai analízis GraphPad Prism 10 programmal történt. Szignifikáns különbséget $p < 0,05$ érték alatt fogadtunk el.

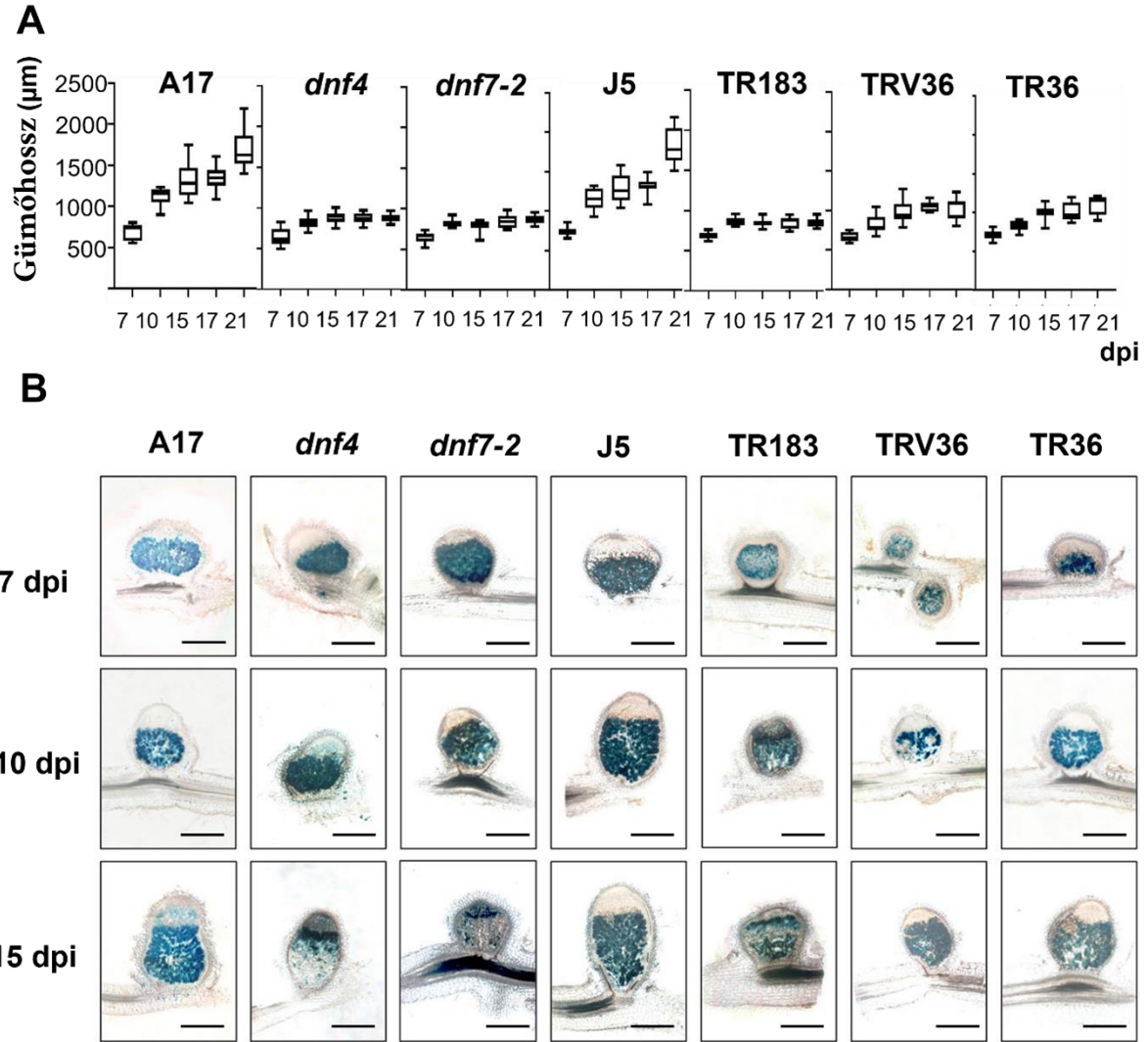
4. EREDMÉNYEK

4.1 A gümők növekedésének és a *nifH* promóter::*GUS* aktivitásának változásai a *dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TR36 és TRV36 mutánsokban

A *dnf4* és *dnf7-2* mutánsokat *M. truncatula* Jemalong A17 háttérben gyors neutronbesugárzással, míg a TR183, TRV36 és TR36 mutánsokat Jemalong 5 ökotípusban γ -sugárzásos mutagenézissel hozták létre. A gümőfejlődés nyomon követéséhez e mutánsokat saját vad típusú kontrolljaikkal hasonlítottuk össze. A kísérletek során a növényeket *S. medicae* WSM419 törzzsel fertőztük, amely a *nifH* promóter::*GUS* (*PnifH*::*GUS*) riporter konstrukciót hordozta. A gümőket a fertőzést követő 7., 10., 15., 17. és 21. napon gyűjtöttük be. A minták hosszanti metszetein mikroszkóposan vizsgáltuk a gümő szerkezetét, és vizsgáltuk a gümők méretét, a GUS hisztokémiai festődés mintázata alapján (18. A, B ábra).

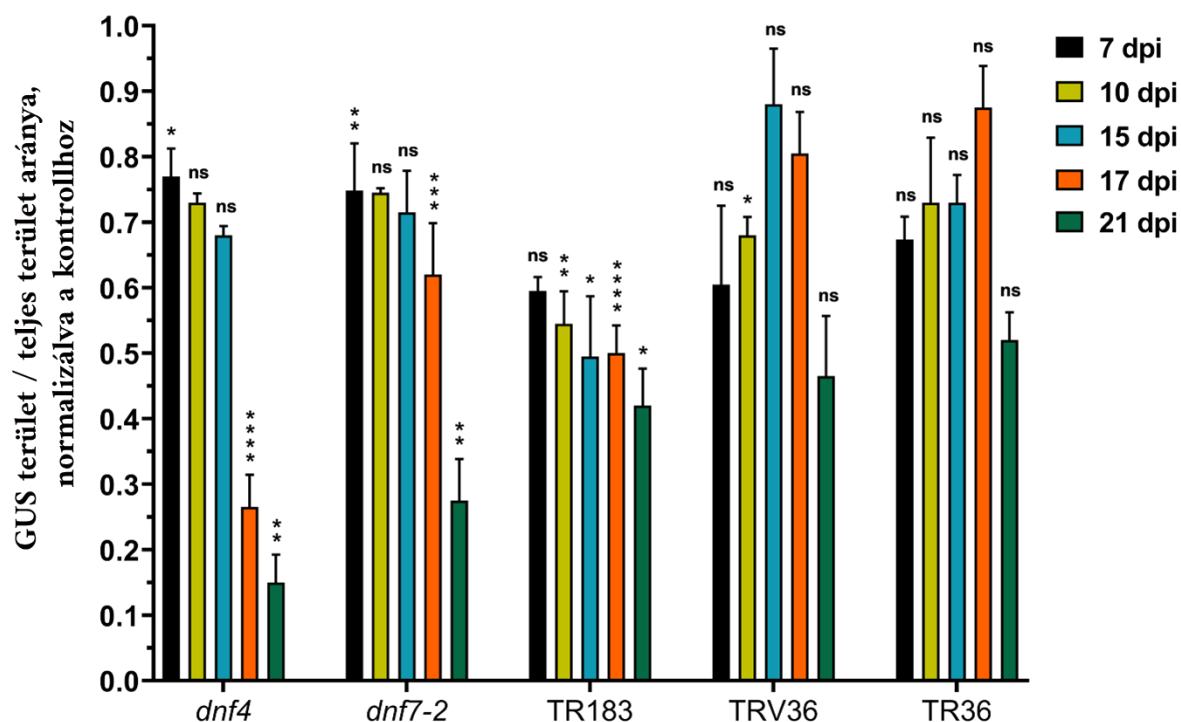
A 7. napon a gümők hossza a vad típusú és a mutáns növények esetében hasonló volt. Az A17 és J5 vad típusú gümők mérete a vizsgálati időszak végéig folyamatosan növekedett, ezzel szemben a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsok gümői ebben az időszakban nem mutattak további növekedést, míg a TRV36 és TR36 vonalak esetében mérsékelt hosszúságbeli gyarapodás volt megfigyelhető (18. A ábra).

Az érett bakteroidok jelenlétét, aminek markere a nitrogénáz enzimkomplex (*nifHDK* operon) expressziója, a *nifH* promóter::*GUS* aktivitás segítségével követtük (18. B ábra, 1. függelék). A 7. napon a GUS-festődés mintázata a vad típusú (A17 és J5) és a *dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TR36 mutáns gümőkben nagyrészt megegyezett: jól elkülöníthető zónázottság és erős festődés volt látható a III. zónában, ami a *nifH* gén megfelelő expresszióját jelezte. A TRV36 vonal ettől eltért: itt kevesebb GUS-pozitív szimbiotikus sejt volt jelen, ami kisebb mértékű fejlődési elmaradást valószínűsített. A 10. és 15. napon, majd később (17. és 21. napon) a vad típusú gümőkben a GUS-pozitív sejtek száma tovább nőtt, míg a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban az aktivitás csak a fiatal ZIII sejtekben maradt fenn. A TRV36 és TR36 gümőkben a pozitív sejtek száma a köztes időpontokban emelkedett, de a vizsgálat későbbi szakaszában – a többi mutánséhoz hasonlóan – csökkent.



18. ábra A gümők növekedése és a *PnifH::GUS* aktivitás alakulása vad típusú és *Fix*⁻ gümőkben. (A) A gümőhossz mérése a fertőzést követő 7., 10., 15., 17. és 21. napon vad típusú (A17, J5) és *Fix*⁻ (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36, TR36) genetikai háttérben. A boxplot diagramok az adott időpontban mért gümőhosszak eloszlását mutatják. Az adatok három független biológiai ismétlésből származnak, minden ismétlésben időpontonként 5 növényről 7–8 gümőt mérve. (B) GUS hisztokémiai festés agarózba ágyazott gümőmetszeteken a fertőzést követő 7., 10. és 15. napon. A kék színeződés a *PnifH::GUS* riporter aktivitását jelzi. Méretarány: 0,5 mm.

A *PnifH::GUS* aktivitás mennyiségi értékeléséhez a GUS-festés során megjelent kék területek arányát határoztuk meg a teljes gümőfelülethez viszonyítva (19. ábra). A GUS-pozitív terület nagysága a *dnf4* mutánsban a 17. napon, a *dnf7-2* vonalban pedig a 21. napon jelentősen visszaesett. A TR183 esetében a festett terület kezdettől kisebb volt a többi mutánséhoz képest, és folyamatosan csökkent. A TRV36 és TR36 gümőkben ezzel szemben a GUS-pozitív terület a 15., illetve 17. napig növekedett, majd ezt követően drasztikus csökkenés következett be.



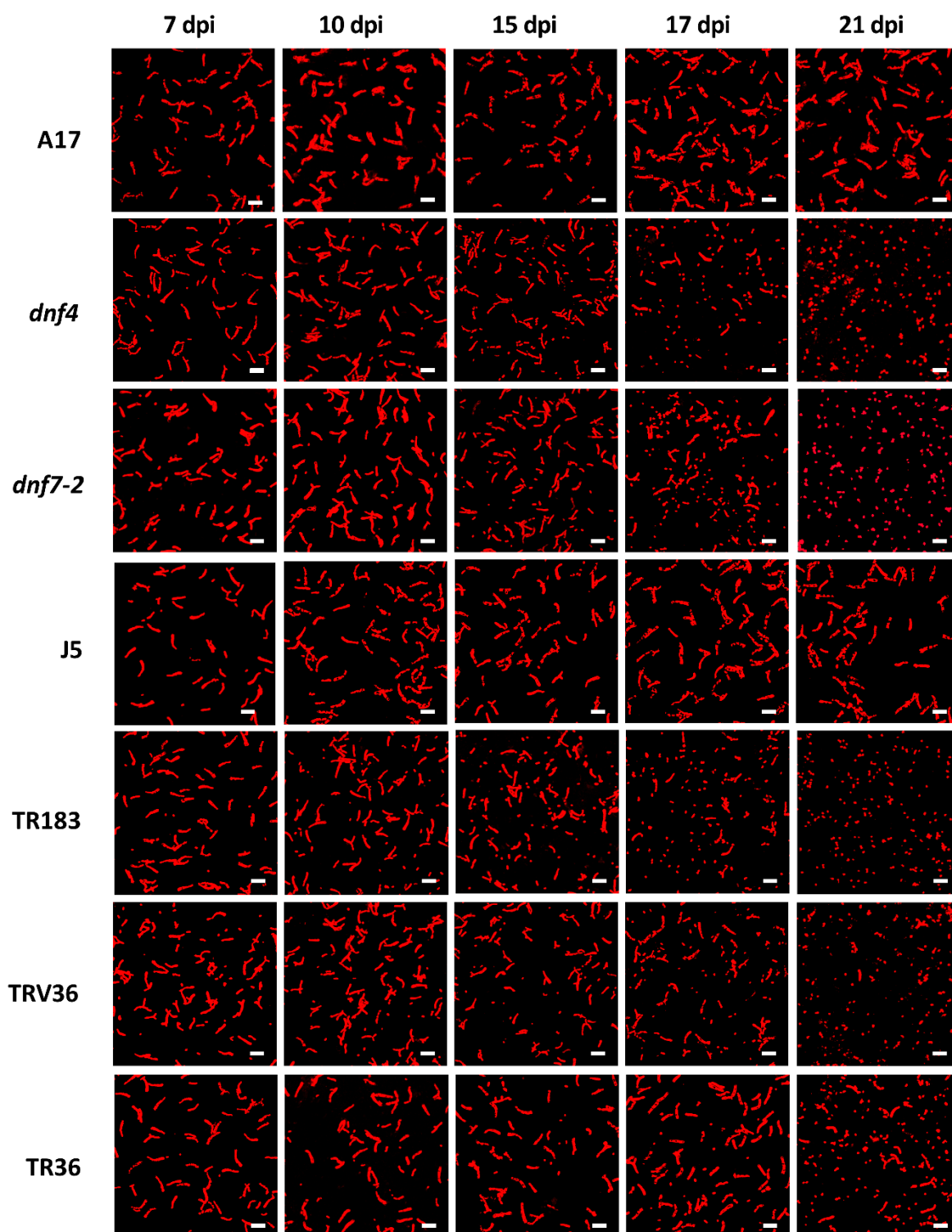
19. ábra A *PnifH::GUS* riportergént expresszáló baktériumokat tartalmazó növényi sejtek mennyiségi értékelése. Az oszlopok a GUS-pozitív terület arányának átlag $\pm$ szórását mutatják, a vad típusú kontrollhoz viszonyítva normalizálva. A csillagok a megfelelő vad típusú kontrollhoz képest szignifikáns különbséget jelölnek az adott időpontban, egyutas ANOVA-elemzés alapján (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: nem szignifikáns). Az adatok három független kísérletből származnak, mindegyikben 6–8 gümő vizsgálatával.

4.2 A differenciálódott bakteroidok fokozatos eltűnése a *Fix⁻ M. truncatula* mutánsokban

A bakteroidok hossza jól jellemzi differenciáltsági állapotukat. Laboratóriumi tenyészetben, illetve differenciálatlan formában a *S. medicae* sejtek általában 1–2 μm hosszúak, a sejtciklus fázisától függően. Szimbiózis során azonban a bakteroidok akár 10 μm -re is megnyúlhatnak, és a 2 μm -nél hosszabb sejtek differenciáció alatt állónak tekinthetők.

A differenciáltság vizsgálatához a vad típusú és *Fix⁻* mutáns gümőkől származó bakteriumpopulációkat izoláltuk, hőkezeléssel inaktiváltuk, majd propídium-jodiddal (PI) festettük, és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk (20. ábra). A fertőzést követő 7. napon minden gümőtípusban jelen voltak megnyúlt bakteroidok. A vad típusú gümőkben ez a sejtcsoport egészen a 21. napig – a vizsgálat legkésőbbi időpontjáig – fennmaradt. Pontszerű, nem differenciálódott baktériumok a ZII korai részében és az infekciós fonalakban találhatók, de arányuk egyre kisebb, ahogy a gümő öregszik. Szeneszencs gümők esetében ismét megjelennek, és egyre gyakoribbá válnak a pontszerű formák, amik az infekciós fonalakból kiszabadult és a halott anyagon elszaporodott szaprofitává vált rhizobiumok.

A vad típusú gümőkkel szemben a mutáns gümőkben (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183 és TRV36) a megnyúlt bakteroidok aránya 15., illetve 17. naptól kezdve fokozatosan csökkent, miközben egyre nagyobb hányadot képviseltek a kisméretű, differenciálatlan, szaprofitikus jellegű baktériumok. A 21. napra ezek az utóbbiak váltak dominánssá mind a négy mutánsban. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a TR36 gümőkben is, bár itt a változás késleltetve következett be.

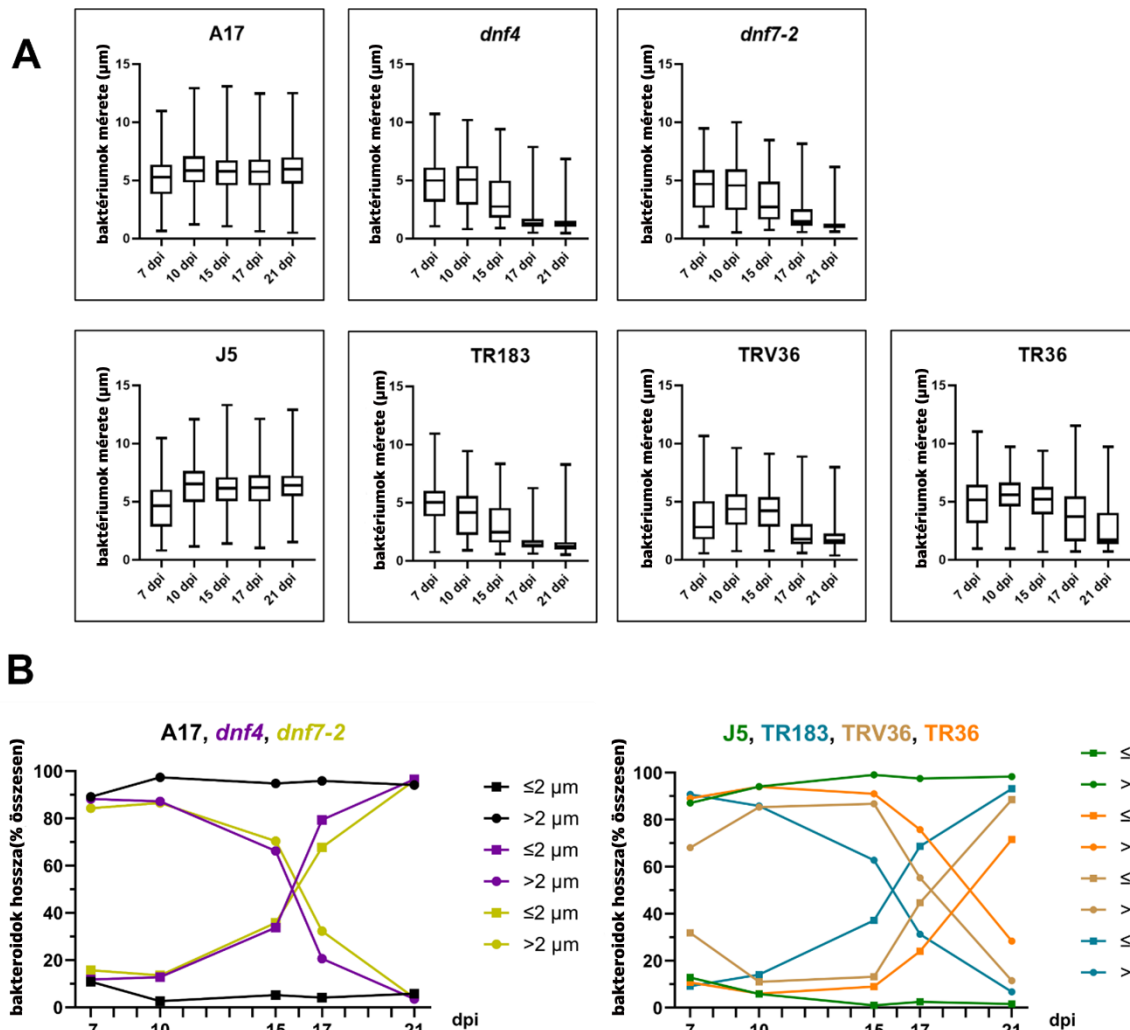


20. ábra A rhizobium populáció összetételének változásai vad típusú és Fix⁻ mutáns gümőkben. Propidium-jodiddal festett, izolált bakteriumpopulációk konfokális mikroszkópos felvételei vad típusú (A17 és J5) és Fix⁻ mutáns (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36 és TR36) gümőkben, a fertőzést követő 7., 10., 15., 17. és 21. napon. Méretarány: 5 µm.

A megfigyelések mennyiségi értékeléséhez a bakteroidok sejthosszát konfokális felvételeken mértük, időpontonként 500–1000 sejtet elemezve (21. ábra, 3. függelék). A fertőzést követő 7. napon a 2 µm-nél hosszabb bakteroidok aránya a vad típusú A17 és J5 gümőkben 87,1–89,1% volt, ami erőteljes korai differenciációt jelez. A legtöbb mutáns ebben a szakaszban szintén normális bakteroidfejlődést mutatott, kivéve a TRV36 vonalat, ahol a differenciáció késleltetett: a sejtek 31,9%-a kisméretű és differenciálatlan maradt.

A méreteloszlás időbeli változásának elemzése (21. A és 21. B ábra) szerint a vad típusú gümőkben a bakteroidok hossza 7 és 10 nap között kissé nőtt, majd állandó szinten maradt. A *dnf4* és *dnf7-2* gümőkben a 7. és 10. napon a bakteroidok szintén megnyúltak, méretük hasonló volt a vad típushoz. A későbbi időpontokban azonban a baktériumok átlagos hossza csökkent, és a csökkenés üteme a *dnf4* esetében gyorsabb volt, mint a *dnf7-2*-ben. A TR183 mutánsban a rhizobiumok hossza folyamatosan csökkent a vizsgálat teljes időtartama alatt. A TRV36 és TR36 gümőkben kezdetben enyhe növekedés volt tapasztalható, ezt azonban 17. naptól jelentős csökkenés követte. Összességében minden Fix⁻ mutáns gümőben a megnyúlt bakteroidok aránya fokozatosan visszaesett, és végül kisméretű, szaprofitikus jellegű rhizobiumok vették át a helyüket, amelyek morfológiája a laboratóriumban tenyésztett sejtekére emlékeztetett — ez a szimbiotikus differenciáció megszűnésére utal.

Bár az összes Fix⁻ mutáns hasonló mintázatot követett, a szeneszcencia megjelenésének ideje és mértéke eltért, amit jól mutat a ≤ 2 µm és a >2 µm hosszú bakteroidok arányának változása (21. B ábra). A vad típusú gümőkben ez az arány 10. naptól stabil maradt. Ezzel szemben a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban 15. naptól gyorsan csökkent a >2 µm-es bakteroidok aránya, miközben a kisebb sejtek aránya nőtt. A TRV36 és TR36 esetében hasonló eltolódás jelentkezett, de csak 17. naptól. A TR36 gümőkben a 21. napon még mindig jelen volt egy kisebb hányad (28,4%) megnyúlt bakteroid, míg a többi mutáns ekkorra szinte teljes egészében kisméretű, differenciálatlan baktériumokból állt (3. függelék).



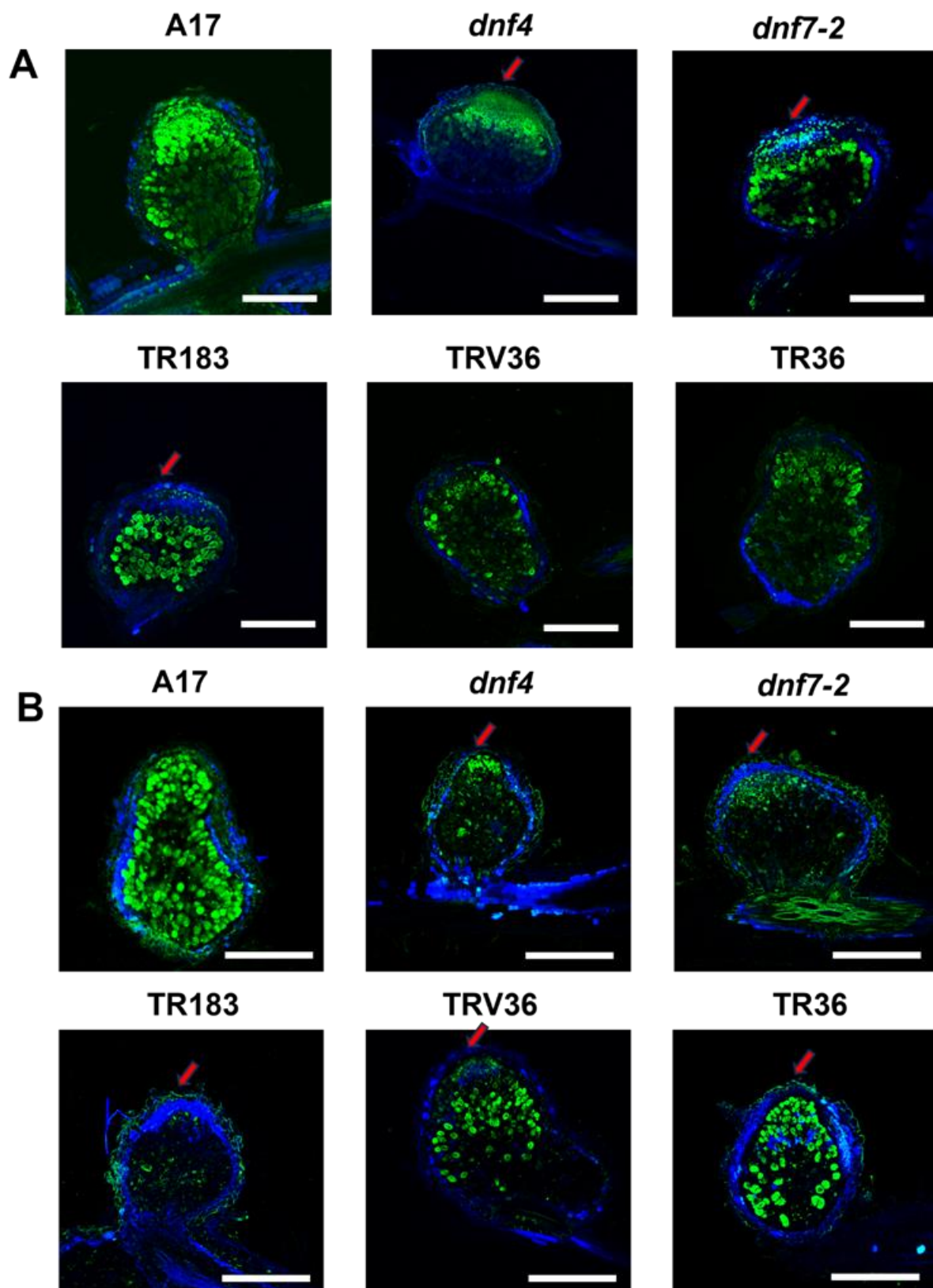
21. ábra A baktériumsejtek méreteloszlásának kvantitatív értékelése vad típusú és *Fix⁻* mutáns gümőkben. (A) A bakteriumpopulációk méreteloszlása a fertőzést követő 7–21. napon. A sejthosszak mérése konfokális felvételek alapján, az Olympus FV10-ASW 4.0 szoftverrel történt. (B) A differenciált (>2 μm) bakteroidok kialakulásának és a szaprofitikus jellegű (≤2 μm) baktériumok megjelenésének időbeli változása. Az adatok három biológiai ismétlésből származnak (n = 500–1000 sejt).

4.3 A gyorsan előrehaladó gümőszenescenciát zárt endodermisz kísérí

A *M. truncatula* gümők hosszirányú növekedését a folyamatosan aktív apikális gümőmerisztéma biztosítja, amely folyamatosan hoz létre posztmitotikus sejteket. Ezek egyre része nem-szimbiotikus sejt marad, 4C kromoszómaállománnyal, míg a szimbiotikus sejtek belépnek az endoreduplikációs ciklusokba.

A vad típusú és mutáns gümők szerkezeti különbségeinek részletesebb vizsgálatához *S. medicae* WSM419 baktériummal fertőzött gümőket gyűjtöttünk be a fertőzést követő 7. és 17. napon, agarózba ágyaztuk, majd 75 μm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket Syto 9 festékkel jelöltük (zöld fluoreszcencia) az élő bakteroidok kimutatásához, míg a gümő endodermiszét UV-fényben kék autofluoreszcenciája tette láthatóvá (Tirichine és mtsai., 2000).

A 7. napon minden gümő tartalmazott élő bakteroidokat tartalmazó szimbiotikus sejteket, azonban ezek száma nagyobb volt a vad típusú gümőkben. Figyelemre méltó, hogy már ebben a korai szakaszban is zárva volt az endodermisz a merisztéma felett a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban, míg a vad típusú (A17 és J5), valamint a TRV36 és TR36 gümőkben nyitva maradt (22. A ábra). A 17. napon a vad típussal ellentétben az endodermisz minden mutáns gümőben zárva volt. Ekkorra a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 gümőkben a nagy méretű szimbiotikus sejtek teljesen eltűntek, míg a TRV36 és TR36 gümők ebben a szakaszban jobban hasonlítottak a vad típusúra (22. B ábra).

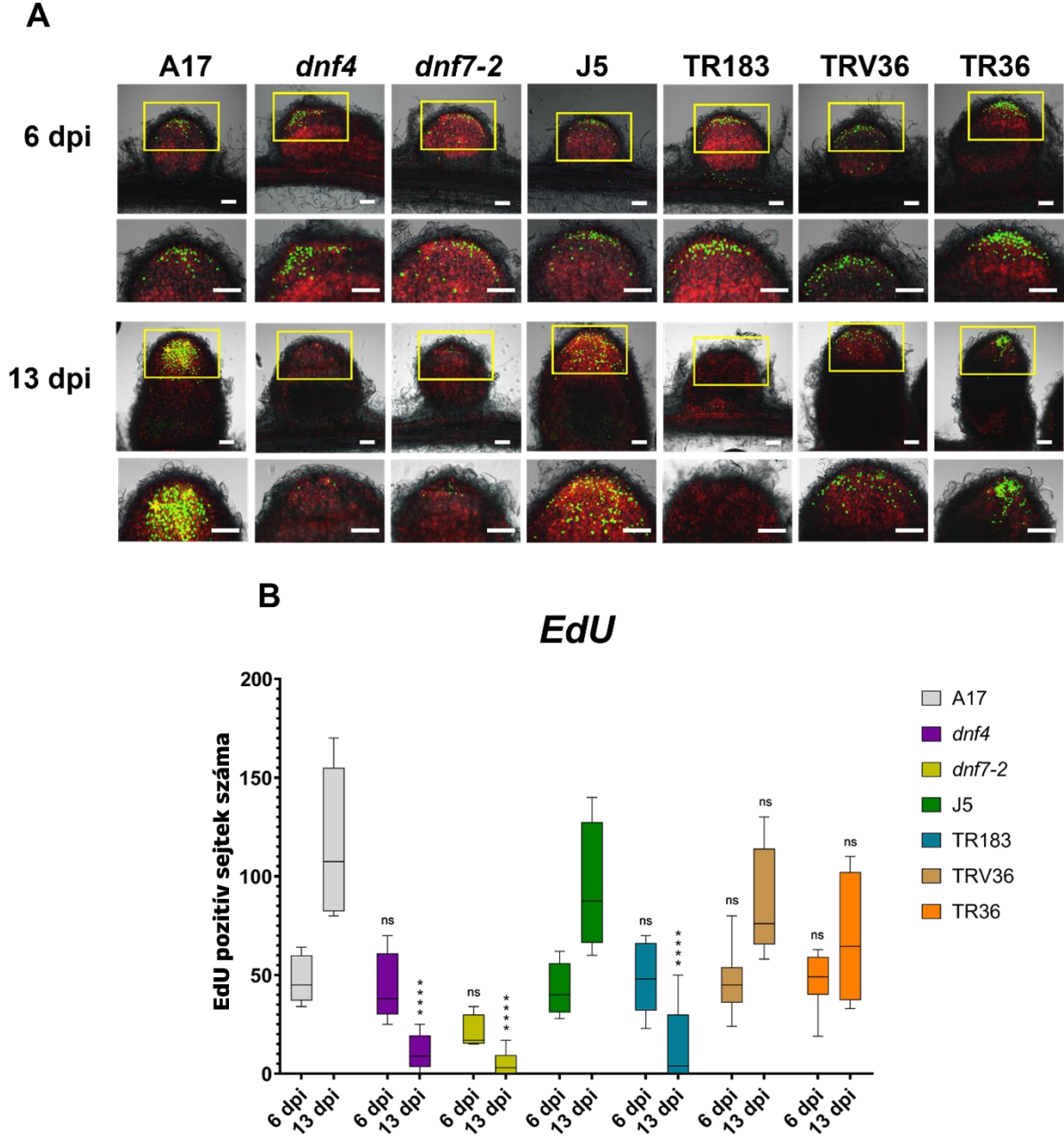


22. ábra Korai endodermisz-záródás hatástalan gümőkben. A vad típusú (A17) és mutáns (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36 és TR36) *M. truncatula* gümők hosszanti metszetein az endodermisz és az élő bakteroidokat tartalmazó szimbiotikus sejtek megjelenítése a fertőzést követő 7. napon (A) és 17. napon (B). Az endodermisz kék autofluoreszcenciával, míg az élő baktériumok Syto9 festéssel zöld fluoreszcenciával láthatók. A piros nyilak a gümő csúcsán zárt endodermiszt jelölik. Méretarány: 250 μ m (A), 500 μ m (B).

A sejtciklus aktivitásának vizsgálatához a vad típusú és mutáns gümőkben, *de novo* DNS-szintézist vizsgáltunk a 6. és 13. napon 5-etinil-2'-dezoxiuridin (EdU) beépítésével, 15 órás jelölési idővel. Az Alexa 488-jelölt azid reagált a beépült EdU-val, így erős zöld fluoreszcenciát adott a frissen szintetizált DNS-t tartalmazó, S-fázisban lévő sejtmagi DNS-ben – akár mitotikus sejtciklusban, akár endoreduplikáció során (Vanstraelen és mtsai., 2009). A feleslegben maradt, fluorofórral jelölt azid eltávolítása után a gümöket DAPI-val ellenfestettük, hogy minden, EdU-val nem jelölt mag is látható legyen; ezeket a konfokális felvételeken vörös pszeudoszínnel jelenítettük meg (23. A ábra).

A 6. napon, a fejlődés korai szakaszában minden gümőtípusban voltak EdU-jelölt magok, főként a merisztémában, de ZII-ben is, endoreduplikációt mutató sejteknél. A 13. napon a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 gümőkben az EdU fluoreszcencia alig volt kimutatható, ami a sejtciklus-aktivitás teljes megszűnésére és a merisztéma eltűnésére utalt. Ugyanebben az időpontban a TRV36, TR36 és vad típusú gümőkben a merisztéma még működött, és ZII-ben továbbra is zajlott a genom endoreduplikációja, amit az EdU fluoreszcencia igazolt.

A *de novo* DNS-szintézist végző sejtek számának mennyiségi értékeléséhez megszámláltuk az EdU-pozitív sejteket a vad típusú és mutáns gümőkben a 6. és 13. napon (23. B ábra). A 6. napon az EdU-pozitív sejtek száma minden genotípusban hasonló volt, kivéve a TR183-at, amelynél kevesebb jelölt sejtet találtunk. A 13. napon a vad típusú gümőkben jelentős növekedés volt megfigyelhető az EdU-pozitív sejtek számában, ami aktív DNS-szintézisre utalt. Mérsékelt növekedés volt látható a TRV36 és TR36 gümőkben is. Ezzel szemben a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban meredek csökkenés következett be az EdU-pozitív sejtek számában, ami a DNS-szintézis korai leállítását és a sejtosztódás, illetve az endoreduplikáció gátlását jelezte ezekben a gümőkben.



23. ábra A *de novo* szintetizált DNS kimutatása és mennyiségi értékelése vad típusú és *Fix*⁻ gümőkben a fertőzést követő 6. és 13. napon. (A) Vad típusú és mutáns gümőkben a *de novo* DNS-szintézist végző sejtmagok EdU-beépüléssel (zöld fluoreszcencia) láthatók, míg az EdU-val nem jelölt magokat DAPI-val festettük, és a konfokális felvételeken vörös pszeudoszínnel ábrázoltuk. A sárga téglalapok az egyes képek alatt nagyítva bemutatott területeket jelölik. Méretarány: 100 μ m. **(B)** Az EdU-pozitív sejtek számának kvantitatív értékelése vad típusú és mutáns gümőkben. A boxplot diagramok a mutánsokban mért EdU-pozitív sejt számot mutatják. Az adatok három független kísérletből származnak ($n = 6-8$ gümő). A csillagok az adott időpontban a megfelelő vad típusú kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést jelölnek, egyutas ANOVA-elemzés alapján (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: nem szignifikáns).

4.4 A magas ploidiaszámú sejtmagok arányának csökkenése *Fix*⁻ mutáns gümőkben

Az EdU-beépülés csökkenése a *Fix*⁻ mutáns gümőkben arra utal, hogy a merisztéma-aktivitás és a szimbiotikus sejtek endoreduplikációja egyaránt visszaesik. A poliploidizáció mértékének

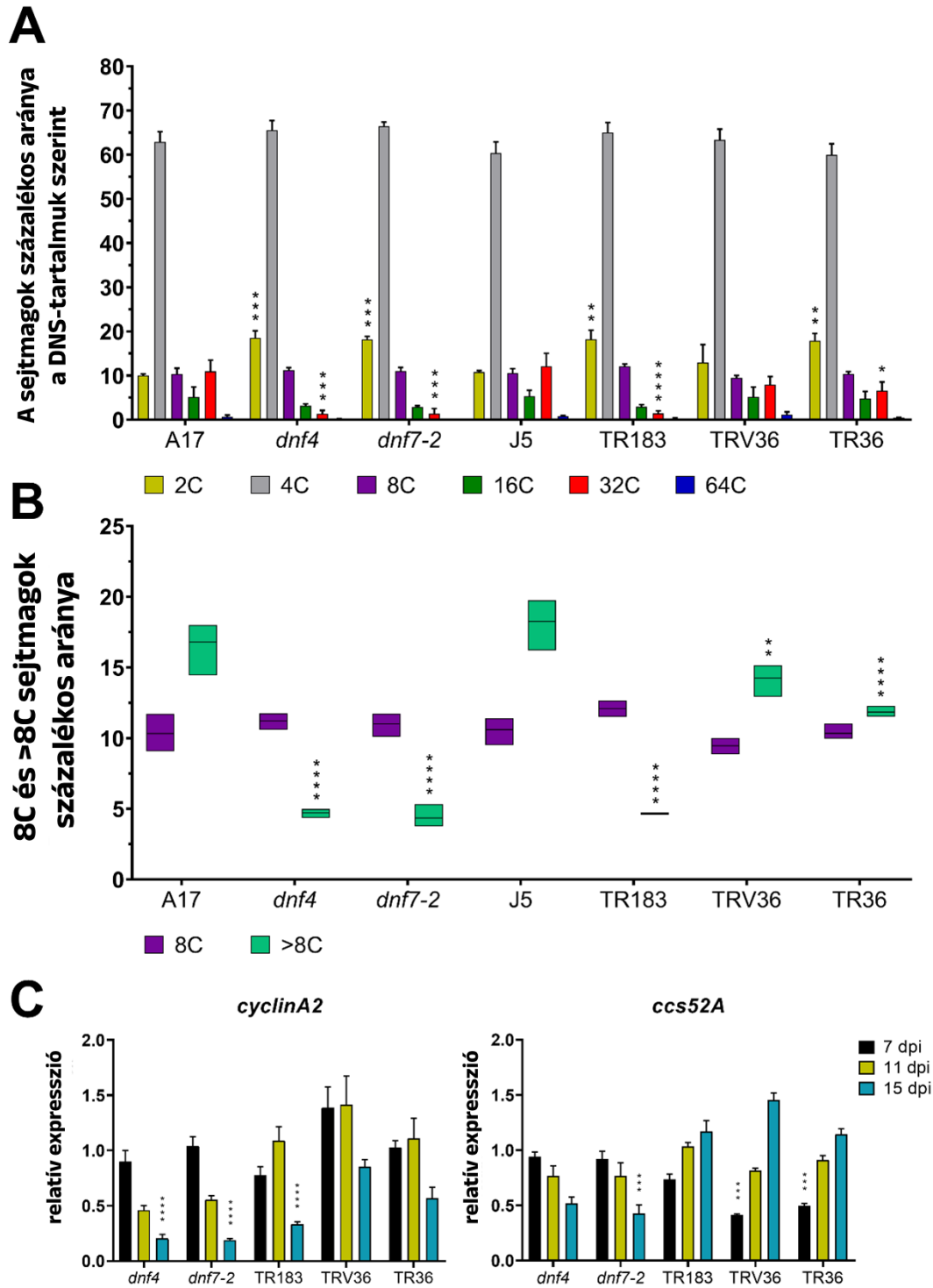
vizsgálatához a vad típusú és mutáns gümőkől a fertőzést követő 15. napon izolált sejtmagok DNS-tartalmát elemeztük. A magokat PI-vel festettük, majd áramlási citometriával osztályoztuk a DNS-tartalom alapján (1C = haploid genom) a következő ploidiaszintekre: 2C, 4C, 8C, 16C, 32C és 64C (24. A ábra).

Korábbi eredmények alapján a gümősejtek 4C DNS-tartalommal hagyják el a merisztémát (Yang és mtsai., 1994; Cebolla és mtsai., 1999), így a 8C érték az első endoreduplikációs ciklus befejezését jelzi. Minden vizsgált minta esetében a 4C sejtmagok alkották a legnagyobb arányú populációt, és a 8C sejtmagok mennyisége hasonló volt a vad típusú és a mutáns gümőkben (24. A, B ábra). Ugyanakkor a *dnf4*, *dnf7-2*, TR183 és TR36 gümőkben a 2C sejtmagok aránya magasabb, míg a 32C és 64C sejtmagok aránya alacsonyabb volt. Ez arra utal, hogy bár az első endoreduplikációs kör ezekben a mutánsokban is végbemegy, a későbbi — különösen a harmadik és negyedik — ciklusok jelentősen gátoltak. Érdekes módon a TRV36 és TR36 gümők ploidia-eloszlása jobban hasonlított a vad típusú J5 gümökhöz, feltehetően a szenescencia későbbi kezdete vagy lassabb üteme miatt.

Bár a 8C sejtmagok aránya minden genotípusban hasonló volt, a >8C DNS-tartalmú sejtmagok teljes aránya jelentősen eltért. A vad típusú A17 és J5 gümőkben a magas ploidiaszámú (>8C) sejtmagok a teljes populáció 16,2%, illetve 18,1%-át tették ki. Ezzel szemben a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban ez az arány drasztikusan, 4,5–5,0%-ra csökkent, míg a TRV36 (14,0%) és TR36 (11,8%) gümőkben mérsékeltebb csökkenést tapasztaltunk (24. B ábra, 4. függelék).

A vad típusú és mutáns gümők sejtciklus-aktivitásának további vizsgálatához RT-qPCR-analízist végeztünk a sejtosztódás markereként ismert mitotikus *cyclinA2* (Roudier és mtsai., 2003), valamint a sejtdifferenciációhoz és az endoreduplikációs ciklusok beindításához szükséges *ccs52A* (Cebolla és mtsai., 1999; Vinardell és mtsai., 2003) gén átíródási szintjének meghatározására. A 15. napon a *cyclinA2* expressziója minden mutáns gümőben alacsonyabb volt a vad típusúhoz képest, és a *dnf4*, illetve *dnf7-2* vonalakban a 7. naptól a 15. napig fokozatosan csökkent (24. C ábra). A *ccs52A* expressziója ezekben a mutánsokban hasonló mintázatot követett: az átíródási szint idővel csökkent, ami összhangban állt a differenciáció károsodásával.

A TR183, TRV36 és TR36 gümőkben a *ccs52A* szintje a 7. napon alacsonyabb volt a vad típusú J5 gümökhöz képest. Ugyanakkor TRV36 és TR36 vonalakban a transzkripció szintje a 11. és 15. napra emelkedett, ami a fejlődési késlekedést tükrözte. A TR183 esetében a *ccs52A* szintje a 11. és 15. napon elérte a vad típusú szintet, mégis elmaradt a szimbiotikus sejtek magas ploidiaszámú magjainak kialakulása, ami arra utal, hogy a *ccs52A* expresszió helyreállása önmagában nem elegendő a teljes endoreduplikáció és a végső differenciáció kiváltásához.



24. ábra A sejtmagok ploidiásintjének áramlási citometriás vizsgálata és sejtciklus-markergének expressziója. (A) A vad típusú *M. truncatula* A17 és J5, valamint *Fix*⁻ mutáns (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36 és TR36) gümök sejtmagjainak DNS-tartalma a fertőzést követő 15. napon. Az adatok három biológiai ismétlésből származnak. (B) A 8C és >8C DNS-tartalmú sejtmagok arányának boxplot ábrázolása genotípusonként. (C) A sejtciklussal összefüggő *ccs52A* és *cyclinA2* gének relatív expressziója 7., 11. és 15. napos gümökben, RT-qPCR-mérések alapján. Az expressziós értékek a vad típushoz viszonyított átlag $\pm$ SD formában jelennek meg, három biológiai ismétlés (6–8 gümő) eredményei alapján. A csillagok az adott időpontban a megfelelő vad típusú kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést jelölnek egyutas ANOVA alapján (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Csillaggal nem jelölt oszlopok között nincs szignifikáns különbség.

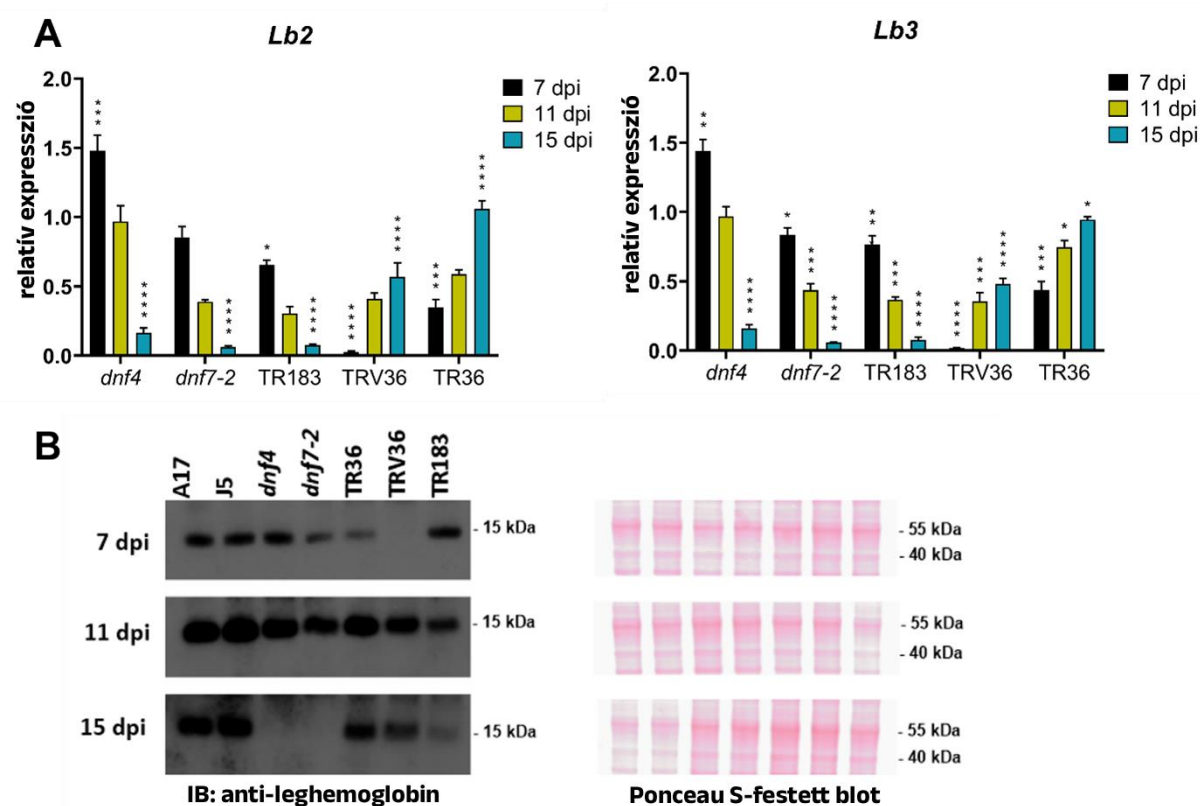
4.5 A leghemoglobin expressziója károsodik a Fix⁻ mutánsokban

A leghemoglobin kulcsfontosságú szerepet játszik a biológiai nitrogénkötés fenntartásában azáltal, hogy az oxigén megkötésével védi a rhizobiumokban működő, oxigénérzékeny nitrogénáz enzimkomplexet. A gümő kéregsejtjei és endodermisze hatékony oxigéndiffúziós gátat képeznek, míg a leghemoglobin a fertőzött növényi sejtekben pufferezi az intracelluláris oxigénszintet. Ez a kettős mechanizmus biztosítja az egyensúlyt a légzés és a nitrogénkötés között (Larrainzar és mtsai., 2020). A leghemoglobin hem-csoportját a növény állítja elő (Wang és mtsai., 2025), és ennek köszönhetően a gümők jellegzetesen rózsaszín árnyalatúak, ami látható jele az aktív nitrogénkötésnek. A gümők szeneszenciája során a leghemoglobint proteázok bontják le (Pladys és Vance, 1993), a felszabaduló hem pedig hem-oxigenázok közreműködésével vas(II)-ionra és biliverdinre bomlik. Utóbbi járul hozzá a szeneszencia gümőkben gyakran megfigyelt zöldes elszíneződéshez (Zhou és mtsai., 2023).

A Fix⁻ mutánsokban tapasztalt korai endodermisz-záródás alapján feltételeztük, hogy ezekben a genotípusokban a leghemoglobin termelése vagy stabilitása sérülhet. Ennek vizsgálatára két leghemoglobin gén — *Lb2* (*Medtr1g011540*; Gallusci és mtsai., 1991; Xi és mtsai., 2013) és *Lb3* (*Medtr5g081000*; Cabeza és mtsai., 2014) — mRNS-szintjét határoztuk meg RT-qPCR-rel vad típusú és Fix⁻ mutáns gümőkben (25. A ábra). Az *Lb2* és *Lb3* expressziója a 15. napra jelentősen visszaesett a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban, amelyeknél korai gümőszeneszenciát figyeltünk meg. Ezzel szemben a késleltetett gümőfejlődéssel jellemezhető TRV36 és TR36 mutánsokban az *Lb2* és *Lb3* expresszió a 7. napon alacsony vagy alig kimutatható volt, de az idő előrehaladtával fokozatosan emelkedett. A TR36 vonalban a 15. napra közel vad típusú szintet ért el, míg TRV36-ban mérsékelten csökkent értéken stabilizálódott, összhangban fejlődési dinamikájukkal.

Mivel *M. truncatula* esetében összesen 12 leghemoglobin gén ismert, a leghemoglobin-fehérjék teljes mennyiségét is megvizsgáltuk vad típusú és Fix⁻ mutáns gümőkben Western blot módszerrel, anti-Lb antitestekkel (25. B ábra). Az eredmények összhangban voltak a génexpressziós adatokkal: a 7. napon viszonylag magas Lb-fehérjeszinteket mértünk a vad típusú A17 és J5 gümőkben, valamint a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban. Ezzel szemben a TR36 vonalban alacsonyabb, míg TRV36 esetében ekkor még nem detektálható Lb-fehérjeszint volt. A 11. napra az Lb-fehérje mennyisége tovább emelkedett mind a vad típusú, mind a legtöbb mutáns gümőben, kivéve a TR183-at, ahol ekkor már csökkenés indult meg. A 15. napon az Lb-fehérje továbbra is magas szinten volt jelen az A17, J5, TR36 és TRV36 gümőkben, míg *dnf4* és *dnf7-2* mutánsokban nem volt kimutatható, TR183-ban pedig erősen

lecsökkent. Ezek a fehérjeszint-változások jól követték az *Lb2* és *Lb3* transzkripció mintázatait, megerősítve a kapcsolatot a leghemoglobin-felhalmozódás zavara és a *Fix*⁻ mutánsokban tapasztalt korai gümőszeneszencia között.



25. ábra A leghemoglobin mRNS- és fehérjeszintjének változása vad típusú és *dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36, TR36 *Fix*⁻ mutáns gümőkben. **(A)** Az *Lb2* és *Lb3* gének relatív expressziója RT-qPCR mérések alapján a fertőzést követő 7., 11. és 15. napon. Az értékek (három független kísérlet eredményei) a vad típushoz normalizáltak, és az ábrán csak a mutánsok adatai szerepelnek. A csillagok az egyutas ANOVA alapján számított statisztikai szignifikanciát jelölik (**p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001). **(B)** Western blot analízis a leghemoglobin-fehérje szintjének meghatározására anti-leghemoglobin antitestekkel (bal panel), valamint Ponceau S festés a fehérjemennyiség ellenőrzésére (jobb panel).

4.6 Szeneszencia-markergének korai aktiválódása a védekezési gének bekapcsolódása nélkül a *Fix*⁻ mutáns gümőkben

Normál körülmények között a gümők fejlődési szeneszenciája általában a fertőzést követő körülbelül négy héten belül kezdődik. Ezzel szemben a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban a bakteroidok lebomlásának és a gümőfejlődés leállásának jelei már a 10. napon megjelentek, míg a TR36 és TRV36 vonalakban ezek a folyamatok a 15. napon indultak el. A gümőszeneszenciában központi szerepet játszanak a proteázok, amelyek lebontják a szimbiotikus sejteket, és a felszabaduló alkotóelemeket a növény más részeiben zajló bioszintetikus folyamatok szolgálatába állítják. Ezek közül a cisztein-proteázok (CP) a

gümőszeneszencia korai molekuláris markereinek számítanak (Van de Velde és mtsai., 2006; Pérez Guerra és mtsai., 2010; Cam és mtsai., 2012).

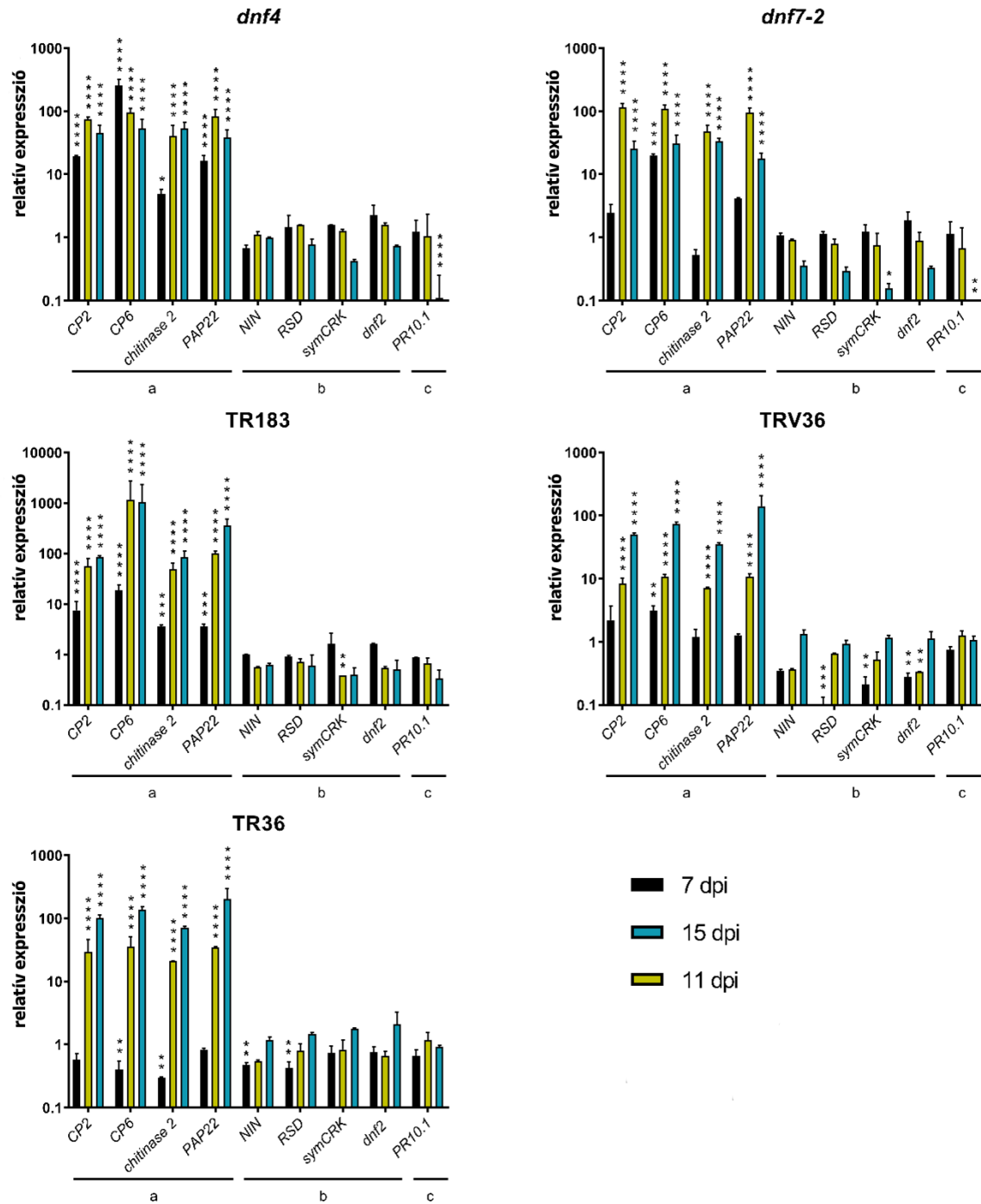
A szeneszencia molekuláris szintű vizsgálatához a fertőzést követő 7., 11. és 15. napon vad típusú és *Fix⁻* mutáns gümőkben RT-qPCR-rel határoztuk meg három génkategória transzkriptszintjét (26. ábra): a) szeneszenciához kapcsolódó gének: *Cysteine Protease 2* (CP2), *Cysteine Protease 6* (CP6), *chitinase 2* és *Purple Acid Phosphatase 22* (PAP22); b) szimbiotikus gének: *NIN* (Liu és mtsai., 2021), *RSD*, *SymCRK* és *DNF2*; c) védekezéshez kapcsolódó gén: *Pathogenesis-Related 10.1* (PR10.1).

A szeneszencia-markergének expressziója minden mutánsban növekedett a 11. napra, és a gyorsan öregedő *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 vonalakban már a 7. napon is magasabb volt a vad típusú A17 és J5 kontrollokhoz képest. Kivételt csak a *chitinase 2* képzett a *dnf7-2* mutánsban, ahol a gén expressziója csak a 11. naptól kezdődően emelkedett (26. ábra). A TR183 vonalban a CP6 expressziója a 11. és 15. napon ezerszeresére nőtt a J5-höz képest, és magasabb volt, mint a többi korai szeneszenciát mutató mutánsban.

A szeneszencia-markergénekkel ellentétben a bakteroidok életben maradásában, a védekezés gátlásában és a korai szeneszencia megelőzésében szerepet játszó szimbiotikus gének expressziója egyik mutánsban sem nőtt. Sőt, *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 gümőkben több ilyen gén transzkriptszintje is alacsonyabb volt a vad típushoz képest, ami arra utal, hogy ezeknek a géneknek a csökkent expressziója hozzájárulhat a bakteroidok korai pusztulásához.

A PR10.1 gén expressziós mintázata hasonló volt a szimbiotikus génekéhez. Minden mutánsban a transzkriptszint a 7. és 11. napon megegyezett a vad típusú kontrollal, míg a 15. napon a gyorsan öregedő *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban még csökkenést is tapasztaltunk. Ezzel szemben a TR36 és TRV36 vonalakban a PR10.1 szintje stabil maradt.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált mutáns gümők korai szeneszenciáját elsősorban a szeneszenciához kapcsolódó gének idő előtti túlzott expressziója, és az ebből következő fokozott proteolitikus aktivitás okozza, nem pedig a gazdanövény védekező mechanizmusainak aktiválódása.



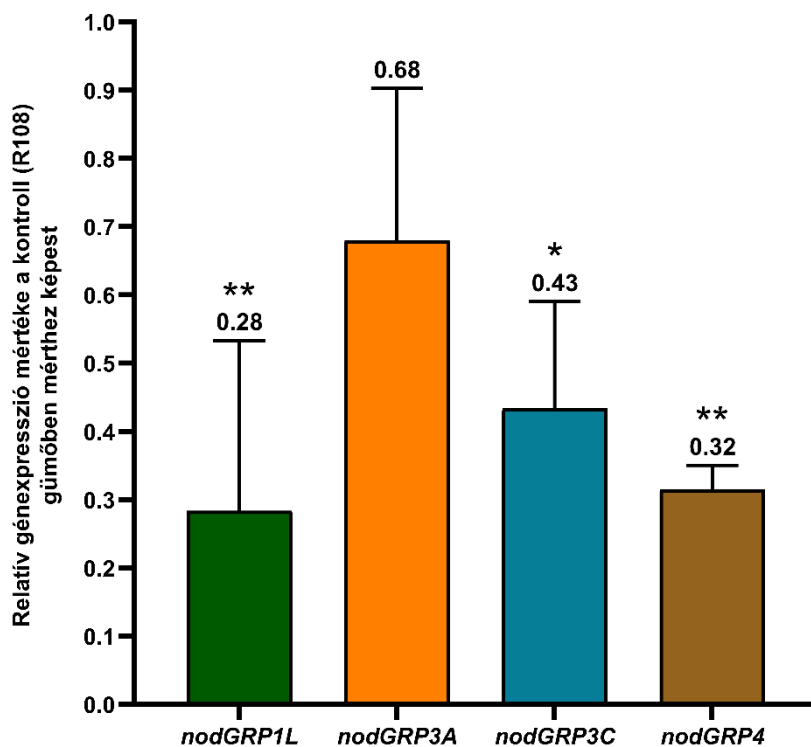
26. ábra Szenescenciában, szimbiotikus immunitásban és növényi védekezésben szerepet játszó markergének RT-qPCR analízise vad típusú és *Fix⁻* mutáns gümőkben a fertőzést követő 7., 11. és 15. napon. a: szenescencia-marker gének; b: szimbiotikus gének, melyek működése szükséges a bakteroid-állapot kialakításához és fenntartásához; c: immunitás gén. A mutánsok relatív expressziós értékei a megfelelő vad típusú vonalakhoz lettek normalizálva (az adatok logaritmikus skálán ábrázolva). Megjegyzés: a TR183 panelen az y-tengely skálája egy nagyságrenddel magasabb, mint a többi grafikonon. Az oszlopok az átlag $\pm$ SD értékeket mutatják három független kísérletből. A csillagok az adott időpontban a megfelelő vad típusú kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést jelölnek, egyutas ANOVA alapján (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Azok az oszlopok, amelyek nem tartalmaznak szignifikanciajelölést, nem mutattak statisztikailag kimutatható különbséget.

4.7 Antiszensz *nodGRP3C* konstrukció hatása a szimbiotikus gümőfejlődésre

Munkánk során a *nodGRP3C* (*Medtr2g069245*) gén szerepét vizsgáltuk a szimbiotikus gümőfejlődés során különböző megközelítésekkel. Első kísérleti elképzelésünk az volt, hogy a gén csendesítésével megértsük, hogyan befolyásolja a gümőképződés folyamatát. Stabil transzformáns növényeket hoztunk létre úgy, hogy a *nodGRP3C* gént fordított orientációban, a 35S promóter után klónoztuk a plazmidkonstrukcióba, majd *A. tumefaciens* EHA-105 közvetítette transzformációval juttattuk *M. truncatula* (R108) növényekbe.

A *nodGRP3C* gén csendesítését RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk a vad típusú (R108) és a *nodGRP3C* antiszensz (*nodGRP3C* AS) mutáns növények gümő mintáiban 15 dpi időpontban. A *nodGRP3C* gén expressziója a mutáns mintában 0,43%-ra csökkent a vad típusú gén expressziójához képest, amivel igazoltuk a géncsökkentést (27. ábra).

Több, a *nodGRP* családba tartozó -a gümőfejlődés során később expresszáldó (IZ és ZIII) - gén expresszióját is vizsgáltuk (27. ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy az antiszensz konstrukciót hordozó növényekben nemcsak a *nodGRP3C* gén szintje csökkent, hanem a *nodGRP3A* és *nodGRP4* gének expressziójában is változásokat tapasztaltunk. A *nodGRP3A* gén expressziója 0,68% értéket mutatott a vad típusú kontrollhoz képest, ami kisebb eltérést jelent, mint a *nodGRP3C* esetében, míg a *nodGRP4* gén szintje 0,32%-ra csökkent. A *nodGRP1L* gén expressziója a mutáns mintában a legalacsonyabb, 0,28%, ami arra utal, hogy az antiszensz konstrukció hatása több, a *nodGRP* családba tartozó gén működésére is hatással van, vagy a fejlődésben korán megakadt gümőben gyengébb expressziót mutatnak a későbbi fázisban aktiváldó szimbiotikus gének.



27. ábra A *nodGRP3C* gén csendesítése RT-qPCR reakcióval igazolva 15 dpi időpontban. A *nodGRP3C* gén expressziója 48%-ra csökkent a kontrollhoz képest. A többi általunk vizsgált *nodGRP* expressziós szintje is csökkent a kontroll (R108) mintához képest. A csillagok az adott időpontban a vad típusú kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést jelölnek, egyutas ANOVA alapján (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Azok az oszlopok, amelyek nem tartalmaznak szignifikanciajelölést, nem mutattak statisztikailag kimutatható különbséget.

4.7.1 A *nodGRP3C* gén csendesítésének hatása a *M. truncatula* növények növekedésére és gyökérgümőinek fejlődésére

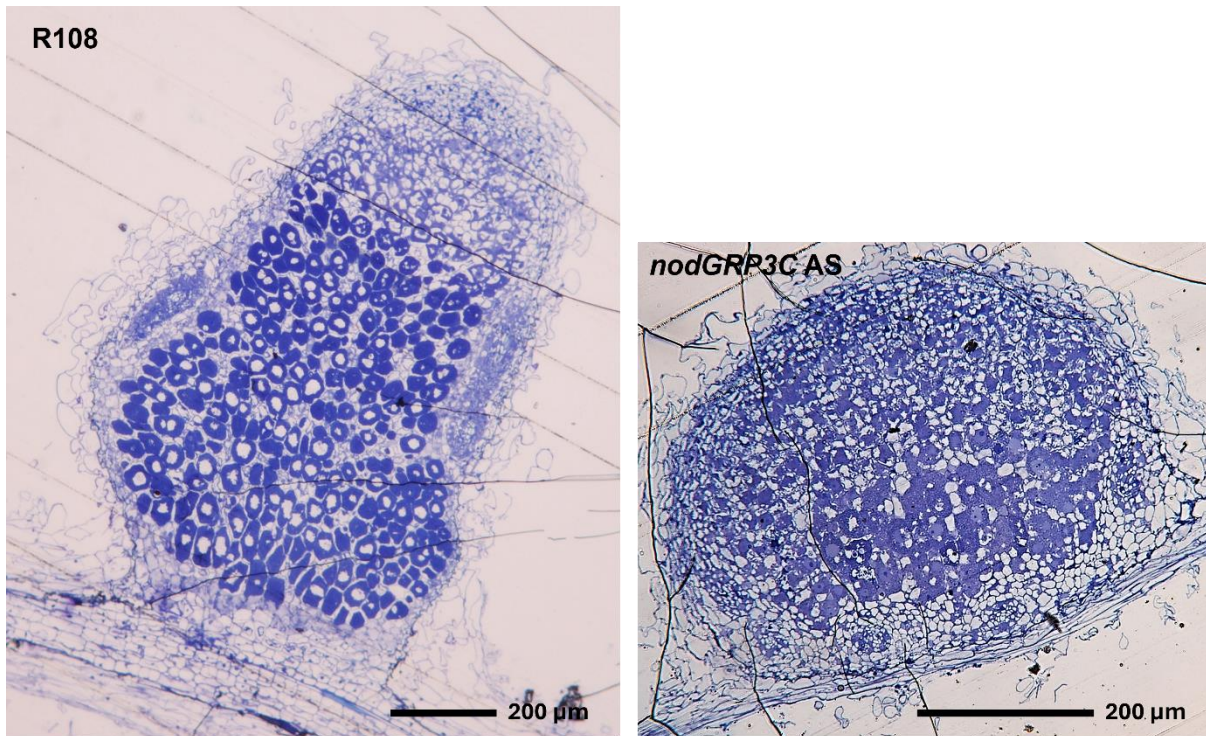
A *nodGRP3C* gén csendesítése drasztikus fenotípus változást okozott 14 dpi időpontban (28. ábra). A transzgenikus *M. truncatula* antiszensz (*nodGRP3C* AS) növények kisebb, alig elágazó hajtásrendszert és gyenge gyökérzetet fejlesztenek, amelyen a gümők száma lecsökkent. A vad típusú R108 növényen megfigyelhető, rózsaszín leghemoglobinban gazdag, elongált gümőkkel szemben a mutánsok gümői kicsik, fehérek. A nitrogén-ellátási zavar végső soron az egész növény növekedésének visszamaradását okozza.



28. ábra A *nodGRP3C* gén csendesítése gátolta a transzgenikus *M. truncatula* növények növekedését és a gümőképződési folyamatát. A fertőzést követően 14 nappal a vad típusú R108 növény és gyökérgümője (A), valamint AS *nodGRP3C* konstrukciót tartalmazó stabil transzformáns transzgenikus R108 növény és a fehér, kisméretű gümők a gyökéren (B). A gümők kinagyított képe keretben látható, külön méretjelzéssel feltüntetve, míg a növények gyökérzete és zöldrészei saját méretarányval szerepelnek.

4.7.2 Mikroszkópos eredmények a *nodGRP3C* AS vonal növényeinek gümőiről

A kisméretű, fehér színű *nodGRP3C* AS gümők metszése során megállapítottuk, hogy kevesebb fertőzött sejt található bennük, és a gümő fejlődése megállt, nincs perzisztens apikális merisztéma (29. ábra). A konfokális kép szövettani szerkezete alapján arra következtethetünk, hogy a mutáns gümő sejtjei nem megfelelően differenciálódtak és nem alakultak ki a nitrogénkötő gümőre jellemző zónázottság (29. ábra).

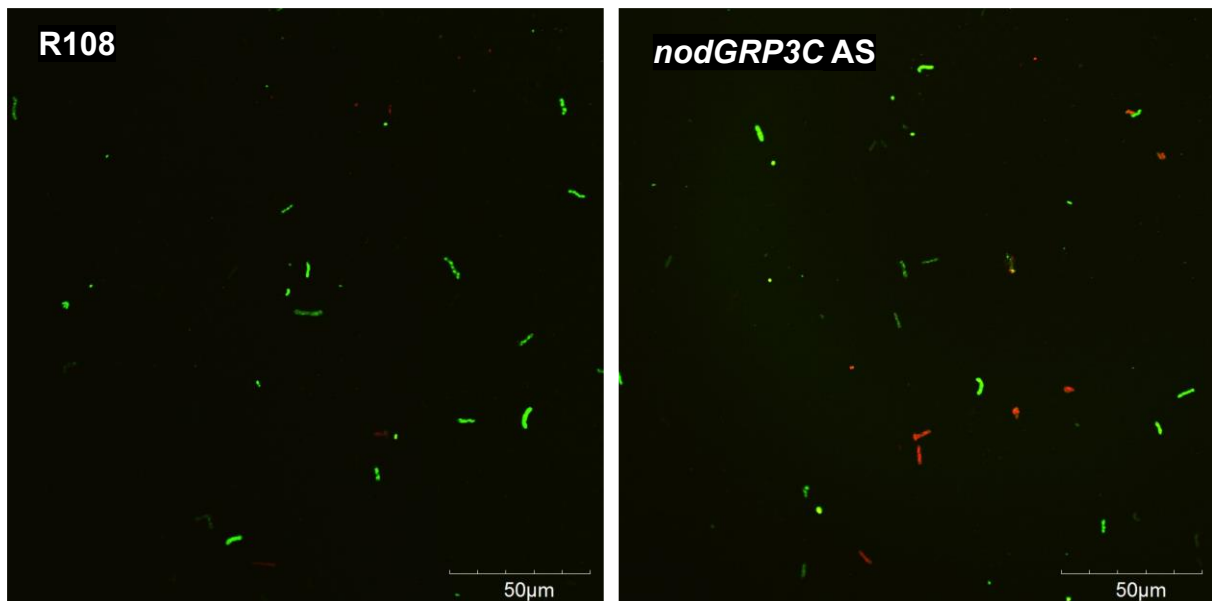


29. ábra A *nodGRP3C* gén csendesítése transzgenikus *M. truncatula* növényekben gátolja a nitrogénfixáló gyökérgümők kialakulását. A Richardson-festett (Richardson és mtsai., 1960) hosszanti gümőmetszetek 14 dpi időpontban készültek.

4.7.3 A vad típusú és *nodGRP3C* antiszensz mutáns gyökérgümőkből izolált bakteroidok vizsgálata

Az izolált bakteroidokat Syto9 és PI fluoreszcens festékekkel festettük meg, amelyek segítségével az élő és elhalt bakteroidok elkülöníthetők (30. ábra).

A vad típusú (R108) bakteroidok esetében a kép zöld fluoreszcenciája alapján látható, hogy a sejtek többsége életképes. A sejtek membránja ép, és a zöld szín azt jelzi, hogy a bakteroidok metabolikusan aktívak. Ezzel szemben a *nodGRP3C* AS mutáns bakteroidok esetében sok a pirosan festődő bakteroid, amely az elhalt vagy membránkárosodott bakteroidokra utal. A mutáns gümőkben megfigyelt alacsony szimbiotikus aktivitás és a fertőzött sejtek csökkent aránya összhangban áll a bakteroidok nagymértékű pusztulásával.

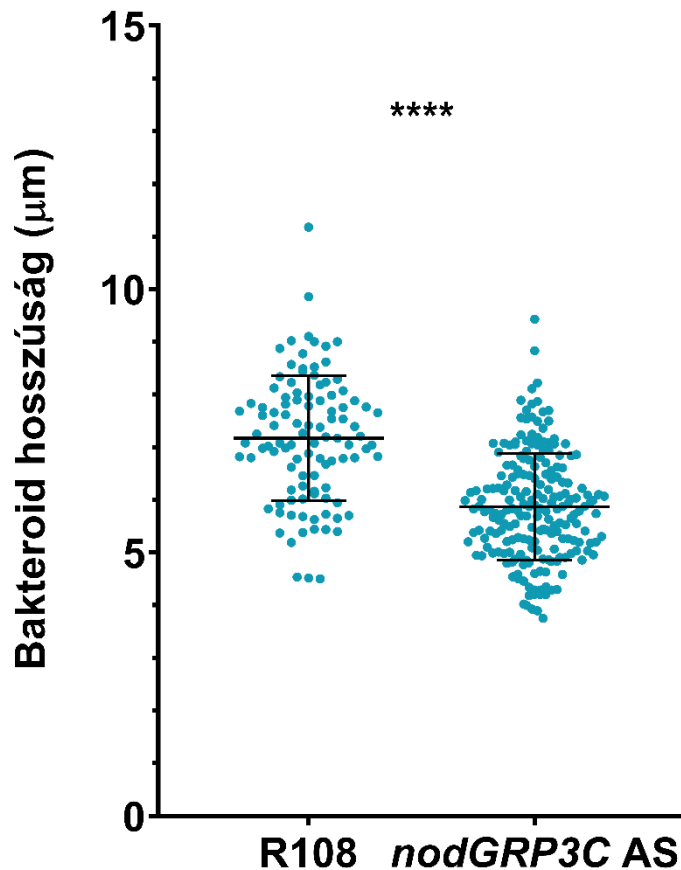


30. ábra A *nodGRP3C* gén csendesítése gátolja a bakteroidok teljes megnyúlását és differenciálódását. Az ábrán fertőzés után 15 nappal izolált bakteroidok láthatók konfokális mikroszkópos felvételen, Syto9+PI sejtfestéssel megfestve. Az R108 a vad típusú *M. truncatula* vonal, míg a *nodGRP3C* AS a gén antiszensz csendesítésével előállított transzformáns. A zöld fluoreszcencia (Syto9) az élő, ép membránnal rendelkező baktériumokat jelzi, míg a piros fluoreszcencia (PI) a sérült membránnal rendelkező vagy elhalt sejteket mutatja.

A bakteroidok hosszának méretbeli eltérése a vad típusú és a *nodGRP3C* antiszensz gümők között 15 dpi időpontban

A mutáns gümőkben izolált bakteroidok átlagos hosszúsága szignifikánsan rövidebb volt a vad típushoz képest (31. ábra). Az R108 gümőkben izolált bakteroidok átlagos mérete körülbelül 7-8 µm volt, míg a *nodGRP3C* AS gümőkben izolált bakteroidoké csupán 6 µm körüli, ami 1-2 µm-es csökkenést jelent.

A statisztikai elemzés páros t-próbával történt, amely szignifikáns különbséget mutatott a két csoport között ($p < 0,0001$). A vad típusú gümőkben a bakteroidok megnyúltak, differenciálódtak, amely összefügg az aktív nitrogénkötési képességgel. Ezzel szemben a mutáns gümők bakteroidjai rövidebbek.



31. ábra A kontroll (R108) és a *nodGRP3C* antiszensz mutáns gümőkől izolált bakteroidok hossz mérésének eredménye 15 dpi időpontban (imageJ). A méretbeli eltérések szignifikánsak (páros t-próba, **** $p < 0,0001$).

4.8 A *nodGRP3C* ektopikus túltermelésének bizonyítása real-time PCR reakcióval és a túltermelés hatásai a gümőképződésre

A *nodGRP3C* gént túltermeltettük stabil transzgenikus növényekben. A *nodGRP3C* OE konstrukciók növényein kisebb, de elongált és rózsaszínű gümők képződtek, amelyek kiértékelése során érdekes morfológiai és fejlődési eltéréseket tapasztaltunk.

A *nodGRP3C* gén túltermeltetésére használt konstrukciót egy *L. japonicus* ubiquitin (*LjUBQ10*) promóter vezérli, amely konstitutív módon aktív, vagyis az általa irányított *nodGRP3C* gén expressziója nem korlátozódik a gümőspecifikus sejtekre, hanem a növény minden szövetében jelen lehet, beleértve a gyökérszöveteket, a hajtásokat és a leveleket is. Ezáltal a túltermeltetés hatása nemcsak a szimbiotikus gyökérgümők fejlődésére, hanem a növény teljes fenotípusára is hatással lehet.

A konstrukció tartalmazza a *nodGRP3C* gén teljes kódoló régióját a szignál peptiddel együtt. A szignál peptid teszi lehetővé a *nodGRP3C* fehérje szekrécióját a sejtől, amely kritikus

szerepet játszhat a növény és a szimbiotikus baktérium közötti interakciókban. A konstrukció tartalmaz továbbá egy szelekciós markert is, a bar gén szekvenciáját, amely a glufozinát-alapú herbicidekkel szembeni BASTA-rezisztenciát biztosítja. A szelekciós marker expresszióját a CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) 35S promóter szabályozza, amely szintén széles körű és erős növényi expressziót biztosít (32. A ábra).

A *nodGRP3C* fehérje ektopikus túltermeltetésének hatására nem tapasztaltunk nagymértékű különbséget a növények fenotípusában a vad típusú növényekhez képest, sem a föld feletti részek, sem a gyökérrendszer tekintetében, valamint a gümőképződés is csak kisebb mértékben tért el (32. B ábra).

A



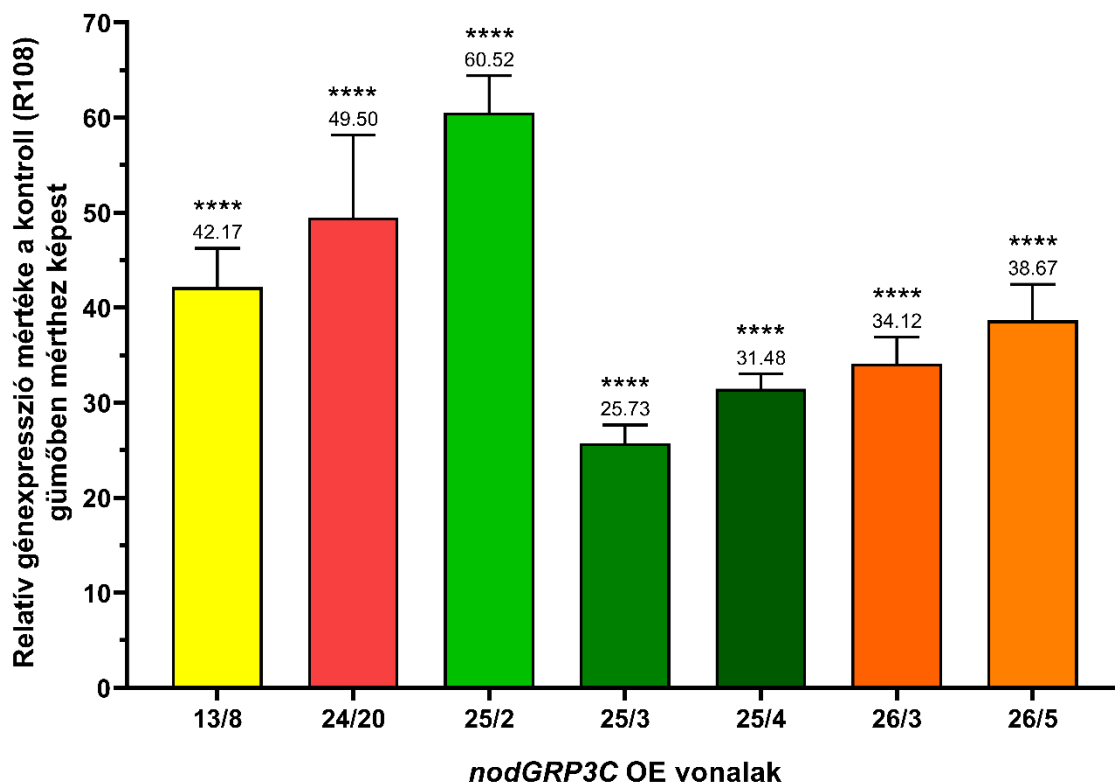
B



32. ábra A *nodGRP3C* gén ektopikus túltermeltetési konstrukciója (A) és hatása *M. truncatula* stabil transzformáns növények fenotípusára (B) 21 dpi időpontban. Az *LjUBQ10* promóter vezérli a *nodGRP3C* gén expresszióját egy szignál peptid szekvenciával, míg a p35S promóter által vezérelt BASTA szelekciós marker biztosítja a transzformált növények azonosítását és szelekcióját. A *nodGRP3C* ektopikus overexpressziója a kontrollhoz hasonló növényfenotípust eredményezett (B).

A transzgenikus vonalakban a *nodGRP3C* gén expresszióját kvantitatív valós idejű PCR-rel (qPCR) vizsgáltuk 8 dpi időpontban (primerek: 2. függelék). Az analízis igazolta, hogy több

független túltermelő vonalban a gén expressziós szintje szignifikánsan emelkedett a vad típushoz képest (33. ábra). Az expressziós adatok alapján kiválasztottuk azokat a vonalakat, amelyekben a túltermelés mértéke a legkifejezettebb volt, és ezeket használtuk fel a további fenotípusos, mikroszkópos és transzkriptomikai vizsgálatokhoz.



33. ábra A *nodGRP3C* expressziójának vizsgálata transzgenikus *M. truncatula* vonalakban real-time PCR reakcióval vizsgálva 8 dpi időpontban. A túltermelő konstrukciót hordozó vonalakban a *nodGRP3C* transzkriptumszintje szignifikánsan emelkedett a vad típushoz képest. A csillagok az adott időpontban a megfelelő vad típusú kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérést jelölnek, egyutas ANOVA alapján (****p < 0,0001).

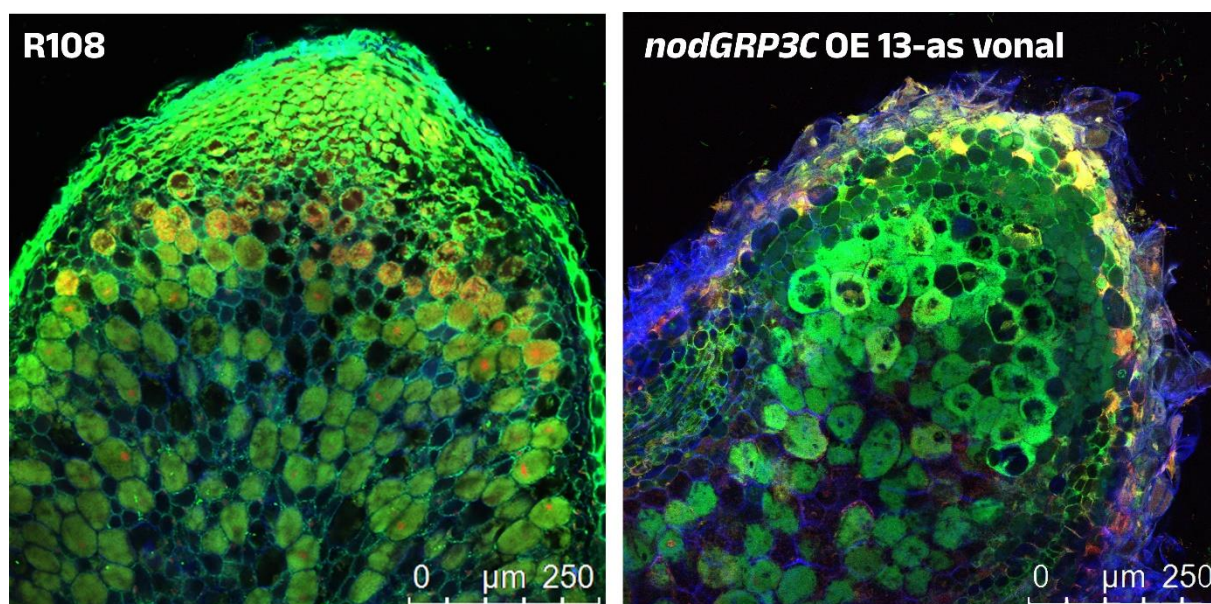
4.8.1 Mikroszkópos megfigyelések a *nodGRP3C* ektopikus overexpressziója esetén

A mikroszkópos vizsgálatok azt mutatják, hogy a *nodGRP3C* túltermelése kisebb mértékben, mint a csendesítés során, de mégis negatívan befolyásolja a gyökérgümők fejlődését, a bakteroidok életképességét és differenciációját a transzformáns növényekben.

Kontroll és *nodGRP3C* OE 13-as stabil transzgenikus növények Syto9+PI festése

A kontroll (R108) és a *nodGRP3C* OE 13-as stabil transzgenikus vonal gümőmetszeteit propidium-jodid (PI, vörös) és Syto9 (zöld) DNS-festéssel kezeltük, majd konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk (34. ábra). A vizsgálatok alapján ebben a felbontásban nem volt

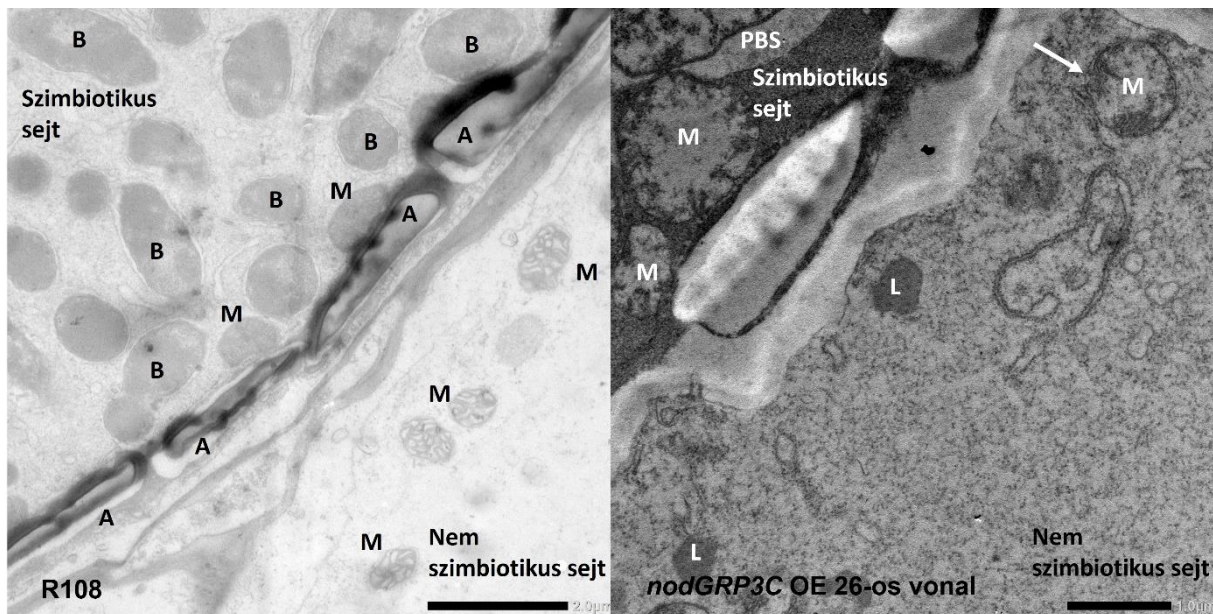
megfigyelhető jelentős különbség a sejtek elhelyezkedésében, alakjában vagy festődési mintázatában a két minta között.



34. ábra A kontroll (R108) és a *nodGRP3C* OE 13-as vonal gümőmetszetei. Syto9 (zöld) és propídium-jodid (vörös) DNS-festéssel jelölve, konfokális pásztázó mikroszkópos felvételen. Skála: 250 μm.

4.8.2 Ultrastrukturális változások a *nodGRP3C* ektopikus túltermelésével létrejött *M. truncatula* gümőkben

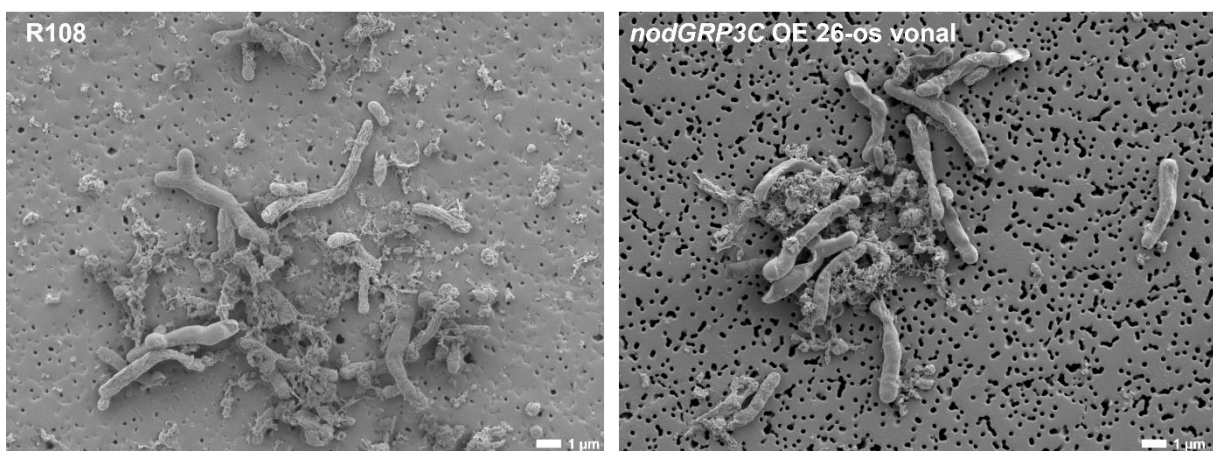
A transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) segítségével részletesen vizsgáltuk a sejtszinten bekövetkező változásokat a *nodGRP3C* fehérje túltermelésével létrejött 26-os stabil transzformáns vonal gümőiben (35. ábra). Megfigyeltük a plazmamembrán szabálytalan betűródéseit, a bakteroidok degradációját, az amiloplasztok túlzott felhalmozódását, a mitokondriumok rendellenes állapotát, és az ennek következtében felhalmozódó lipidcseppeket (lipid droplets; Boren és Brindle, 2012), melyek mind hozzájárulnak a szimbiotikus sejtek nem megfelelő működéséhez.



35. ábra Mitokondriumok ultrastruktúrája az interzóna (IZ) szimbiotikus és nem szimbiotikus gümősejtjeiben. Vad típusú *M. truncatula* (R108; bal oldali kép). A szimbiotikus sejtben a mitokondriumok (M) sűrű kriszta-rendszerrel rendelkeznek, ami fokozott metabolikus aktivitásra utal. A nem szimbiotikus sejtben a mitokondriumok kisebbek és kevésbé redőzöttek. A *nodGRP3C* OE 26-os túltermelő vonal növényének gümőjéből készült mikroszkópos felvétel (jobb oldali kép). A szimbiotikus és nem szimbiotikus sejtek mitokondriumai egyaránt degradálódtak (ritka kriszta-rendszer és töredezett membránok). A: amiloplaszt, B: bakteroid, M: mitokondrium, PBS: peribakteroid tér, L: lipidcsepp, a nyíl a töredezett mitokondrium membránra mutat.

4.8.3 A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeken a *M. truncatula* vad típusú (R108) és *nodGRP3C* 26-os stabil transzformáns OE vonalból izolált bakteroidok

A *nodGRP3C* 26-os stabil transzformáns OE vonalból izolált bakteroidok morfológiailag eltérőek, mint a vad típusú bakteroidok (36. ábra). A transzformáns gümőből izolált bakteroidok felszíne durvább, és egyes sejtek morfológiailag is éretlen állapotot mutatnak.

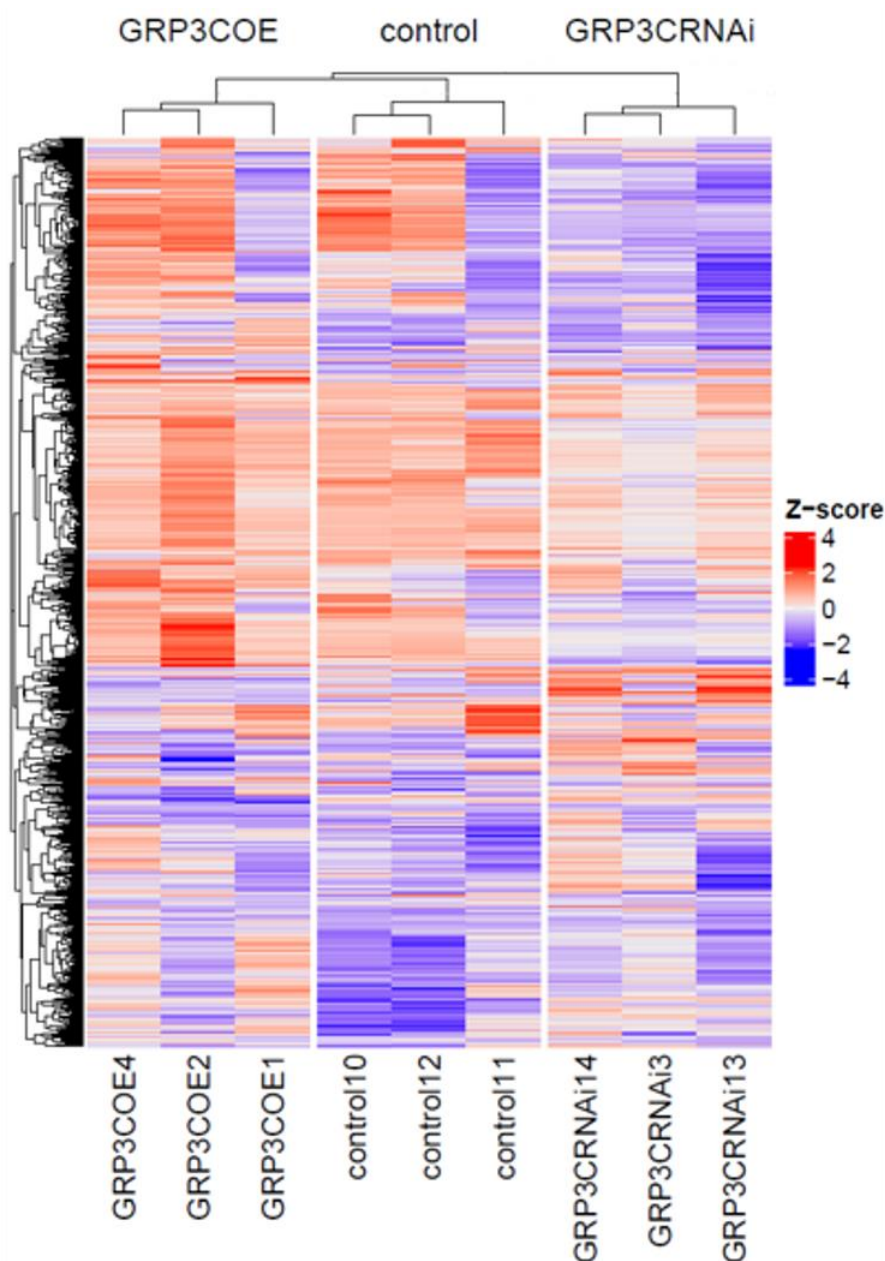


36. ábra Pásztázó elektron mikroszkópos (SEM) képek *M. truncatula* vad típusú (R108) és *nodGRP3C* 26-os OE vonalból izolált bakteroidokról. A vad típusú bakteroidok hosszabbak és differenciáltabbak, míg a *nodGRP3C* OE vonal bakteroidjai rövidebbek és morfológiailag éretlenek.

4.9 Transzkriptomikai eredmények

Növényi (*M. truncatula*) eredmények

A globális génexpressziós profilok összehasonlítása (hierarchikus klaszterezés, hőtérkép – 37. ábra) egyértelműen elkülönítette a *nodGRP3C* OE, a kontroll, valamint a géncsökkentett (RNAi) *M. truncatula* gümőmintákat.



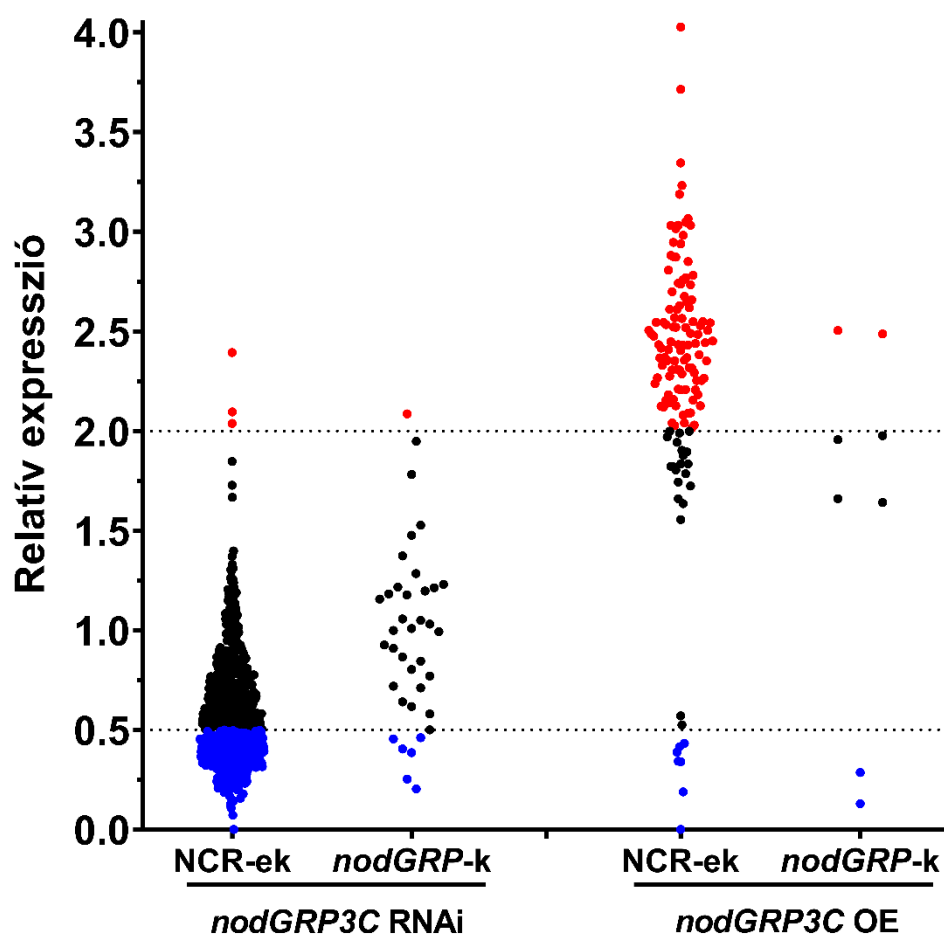
37. ábra A *nodGRP3C* OE, kontroll és RNAi *M. truncatula* gümők globális génexpressziós mintázatainak hierarchikus klaszterezése hőtérképen. A sorok az egyes differenciálisan expresszálódó géneket, az oszlopok az egyes biológiai ismétléseket reprezentálják. A színek a standardizált expressziós értékek Z-score ábrázolását mutatják (piros = emelkedett expresszió, kék = csökkent expresszió a gén átlagos expressziójához képest). Mintacsoportok balról jobbra: *nodGRP3C* túltermelő vonalak: GRP3COE4, GRP3COE2, GRP3COE1, Kontroll: control10, control12, control11, *nodGRP3C* géncsökkentett vonalak: GRP3CRNAi14, GRP3CRNAi3, GRP3CRNAi13.

A *nodGRP3C* túltermelő (OE) és csendesített (RNAi) vonalak transzkriptomikai eredményeit a 6. függelék tartalmazza. Az OE vonalakban nagyszámú gén expressziójának erőteljes emelkedése figyelhető meg (piros szín), különösen a védelmi és stresszválaszhoz kapcsolódó gének esetében. Ilyenek több patogenezis-asszociált fehérje (PR) génje, köztük a thaumatin-szerű PR5 és a PR10 család tagjai, amelyek közül a PR10 ribonukleáz ismertén programozott sejthalált (PCD) és hiperszenzitív választ indíthat el. Emellett a szimbiotikus defenzinek – például *MtDefNS2* és *MtDefMD1* – expressziója is jelentősen nőtt, amelyek antibakteriális hatásuk révén károsíthatják a baktériumokat, előidézve a gümő idő előtti pusztulását.

Az OE mintákban továbbá aktiválódtak a reaktív oxigénfajok (ROS) termelődéséért felelős gének, például a *MtRbohJ* membránhoz kötött NADPH-oxidáz és több peroxidáz gén, ami oxidatív „burst”-re és peroxidatív aktivitásra utal. Hormonális szabályozásban is változás történt: a citokinin-oxidázok (*MtCKX3*, *MtCKX8*) expressziója emelkedett, míg *CLE* és *CEP* szignálpeptid-gének indukálódtak, ami gátolhatja a szimbiózis fenntartását. Emellett a szénhidrát-elosztás is érintett volt, mivel több szacharóz transzporter (*MtSWEET7*, *MtSWEET16*, *MtSUT1.4*) expressziója 2–4-szeres mértékben csökkent.

Ezzel szemben a *nodGRP3C* géncsökkentett vonalakban a kontrollhoz képest számos védekező gén downregulációja (kék szín) volt megfigyelhető, például a *MtDefNS1*, *MtDefNS5* és *PR10-5*. Ugyanakkor bizonyos lebontó folyamatokhoz kapcsolódó gének, mint egy metakaspáz-szerű cisztein proteáz, enyhén emelkedtek, miközben proteázgátlók (Bowman–Birk típusú inhibitorok) csökkentek. A szimbiózis-specifikus génexpresszió is módosult: az early nodulin 11 gén antiszensz transzkriptuma (*asMtENOD11*) felhalmozódott, ami gátolhatja az *ENOD11* működését. Hormonális és kalcium-függő szabályozási komponensek, például *MtARF20*, *MtCaML2* és *MtCaML6* expressziója is mérséklődött.

A globális génexpressziós mintázatok mellett célzottan megvizsgáltuk az NCR peptidek és a *nodGRP* gének transzkripció változásait (38. ábra). A *nodGRP3C* RNAi vonalakban az NCR-gének nagy része csökkent expressziót mutatott a kontrollhoz képest, míg az OE vonalakban túlnyomó többségük expressziója emelkedett. Az OE vonalakban a *nodGRP5A* és *nodGRP5B* expressziója szignifikánsan nőtt, míg a *nodGRP1D* és *nodGRP45* csökkent. Az RNAi vonalakban több *nodGRP* gén is szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott (*nodGRP3B*, *nodGRP10*, *nodGRP1D*, *nodGRP21*, *nodGRP45*, *nodGRP1L*, *nodGRP26*), míg a *nodGRP34* emelkedett expressziót mutatott (38. ábra).



38. ábra A *nodGRP3C* RNAi és *nodGRP3C* OE *M. truncatula* vonalak NCR és *nodGRP* génjeinek relatív expressziója. Bal oldali panel: egyedi génexpressziós értékek (fekete = nem szignifikáns változás, piros = szignifikáns expressziós emelkedés, kék = szignifikáns csökkenés; $p < 0,05$) az RNAi és OE vonalakban a kontrollhoz viszonyítva. Jobb oldali panel: a *nodGRP* géncsalád tagjainak szignifikáns expresszióváltozásai, kék színnel a csökkent, pirossal a növekedett expressziót mutató gének.

A *nodGRP3C* csendesítése mérsékelt immunválaszt eredményezett (a védekező gének elnyomásával), ezáltal a szimbiotikus folyamat megbomlásához vezetett. A *nodGRP3C* gén túltermelése esetén pedig korai immunválaszt váltott ki a növényben, a gümők mintegy fertőzést érzékelve védelmi üzemmódba kapcsolnak, ami káros a szimbiózis szempontjából (Berrabah és mtsai., 2024).

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Különböző kiváltó tényezők, közös következmény a Fix⁻ *M. truncatula* gümőkben

Eredményeink erősen alátámasztják, hogy génhibáktól függetlenül a korai gümőszenescencia általános következmény a Fix⁻ *M. truncatula* mutánsokban, legalábbis az általunk vizsgált vonalakban (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36, TR36). A nitrogénkötésben szereplő gének expressziójának gyors csökkenése, a bakteroidok korai lebomlása, valamint a szenescencia-markergének fokozott expressziója minden mutánsban arra utal, hogy az eredménytelen szimbiotikus kapcsolatok szinte mindig a gümő degradációjához vezetnek. Az olyan szimbiotikus kapcsolatot fenntartó gének, mint a *NIN*, *DNF2*, *SymCRK* és *RSD*, valamint a védekezésben szereplő *PR10.1* gén expressziójának változatlansága tovább erősíti azt a feltételezést, hogy ezekben a mutánsokban a korai szenescenciát elsősorban proteolitikus lebontás, és nem az immunválasz okozza.

Eredményeink egyik kulcsfontosságú eleme a természetes és a Fix⁻ mutánsokban tapasztalt korai szenescencia összehasonlítása. A természetes szenescencia egy jól szabályozott, fokozatos folyamat, amely rendszerint a fertőzést követő ~30. nap után indul meg a gümő öregedésének következményeként, lehetővé téve a sejtés alkotóelemek kontrollált lebontását és újrahasonlítást a nitrogénkötés hirtelen megszakítása nélkül. Ennek szabályozó elemei a fejlődési jelek, hormonális szabályozás és anyagcsere-változások, amelyek lassan vezetnek a gümőfunkciók csökkenéséhez. Ezzel szemben a Fix⁻ mutánsok korai szenescenciáját a szimbiotikus kapacitás gyors elvesztése jellemzi, gyakran szerkezeti rendellenességekkel és bakteroidok gyors pusztulásával kísérve. Bár mindkét folyamatban fokozódik a proteolitikus aktivitás, a korai szenescencia nem mutatja a természetes szenescenciára jellemző, gondosan összehangolt átmeneteket. Ehelyett többnyire genetikai hibák váltják ki, amelyek gátolják a bakteroidok differenciálódását, így a nitrogénkötés nem indul be, és a gümőfejlődés hirtelen leáll.

Fontos eltérés a két folyamat között a védekezési gének szabályozása. Természetes szenescencia során ezek a gének későbbi szakaszban aktiválódhatnak, részeként a szimbiotikus sejtek lebontását kísérő, összehangolt folyamatnak. Ide tartozik a kórokozó-reakciós (PR) gének, proteázok és oxidatív stressz-szabályozók aktiválása. Ezzel szemben a Fix⁻ mutánsok korai szenescenciájában a védekezési gének nem mutatnak jelentős aktivációt. A *PR10.1* szintje stabil maradt, vagy csökkent, ami arra utal, hogy a folyamatot nem kíséri erős immunválasz. Ez ellentétben áll a környezeti stressz által kiváltott, védekezéshez kapcsolódó

gümőszeneszenciával, ahol a PR gének erőteljes aktiválódása figyelhető meg (Berrabah és mtsai., 2024).

A Fix^- mutánsokban észlelt szerkezeti és élettani változások, különösen a gümő endodermiszének korai záródása, kulcsfontosságú tényező lehet a szeneszencia felgyorsulásában. A *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban ez a záródás már a 7. napon kimutatható volt, míg a 17. napon minden Fix^- mutánsra jellemzővé vált, gyakran a merisztéma kimerülésével és a bakteroidok összeomlásával együtt. A zárt endodermisz fizikai akadályt képezhet, amely gátolja a merisztémában a sejtosztódást, korlátozza a víz- és ionfelvételt, valamint a vaszkuláris kötegek körüli lignifikált réteg révén a tápanyagáramlást is. Mivel az endodermisz és a kortikális sejtrétegek oxigéndiffúziós gátként is működnek, a korai záródás és a csökkent leghemoglobin-szint együtt korlátozhatja az oxigénszállítást és az energiatermelést, ami a szimbiotikus sejtek differenciációjának és a bakteroidok működésének romlásához vezethet.

A gümőnövekedés, a bakteroid-differenciáció és a sejtciklus-aktivitás dinamikája további információt nyújt a merisztémafennntartás és a korai szeneszencia kapcsolatáról. Az EdU-jelölési kísérletek szerint a Fix^- mutánsokban a merisztéma aktivitása a kezdeti szakaszban még hasonló volt a vad típushoz, de hamar visszaesett, amit a 13. napon mért alacsony EdU-pozitív sejtszám és a magas ploidiásintű (>8C) sejtmagok csökkenése is alátámaszt. Ezzel párhuzamosan a *cyclinA2* és *ccs52A* gének expressziója is csökkent, ami arra utal, hogy a sejtciklus szabályozásának zavara hozzájárul a szimbiotikus sejtek fejlődésének leállításához.

Bár minden Fix^- mutáns hasonló szeneszencia-mintázatot mutatott, a bakteroidok lebomlásának és a merisztéma aktivitás elvesztésének ideje eltért: *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 esetében mindez a 10. napon kezdődött, míg TR36 és TRV36 mutánsokban csak a 15. napon, lassabb leghemoglobin-csökkenéssel és fokozatosabb romlással. Ez arra utal, hogy a különböző mutációk eltérő mértékben és ideig teszik lehetővé a szimbiotikus sejtek differenciálódását, mielőtt beindulna a szeneszencia.

Összességében eredményeink azt támasztják alá, hogy a Fix^- mutánsok korai gümőszeneszenciája komplex, összehangolt folyamat, amely magában foglalja az oxigénszabályozást, a proteolitikus aktivitást és a merisztémafennntartást. Ellentétben a fejlődési eredetű, természetes szeneszenciával, ez a folyamat elsősorban a szimbiotikus differenciáció zavara, az anyagcsere-egyensúly megbomlás és a bakteroidok életképességének fenntartásában való kudarc következménye.

A jövőbeli kutatásoknak ki kell terjedniük a korai szeneszencia molekuláris kiváltó okainak feltárására, például összehasonlító transzkriptomikai és proteomikai elemzésekkel, illetve az

endodermisz áteresztőképességének, az oxigénpuffer-kapacitásnak vagy a proteáz-aktivitásnak a célzott módosításával, hogy azonosítsuk a gümőélettartam meghosszabbításának lehetséges stratégiáit. Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a pillangósvirágú növények és a rhizobium baktériumok közötti szimbiózis hatékonyságának növeléséhez, ami a fenntartható mezőgazdaságban kulcsfontosságú.

5.2 Eredmények megvitatása a *nodGRP3C* funkcióról

A *nodGRP3C* gén kísérleteink alapján alapvető szerepet tölt be a *M. truncatula* nitrogénkötő gümőinek fejlődésében, valamint a növény–baktérium szimbiotikus kapcsolatban. Többféle kísérleti megközelítést alkalmazva vizsgáltuk a *nodGRP3C* gén funkcionalitását, szabályozását és annak hatásait a gümőképződés folyamatára.

A *nodGRP3C* gén expressziójának csökkentése jelentős morfológiai és fiziológiai eltéréseket okozott a gyökérgümőkben. A *nodGRP3C* hiányában kialakult gümők morfológiailag kisebbek, gömb alakúak és fehér színűek voltak. Emellett a konfokális mikroszkópos felvételeken jól látható volt a csökkent szimbiotikus sejtszám. A bakteroidok differenciálódási folyamata elindult a fertőzött sejtekben, de nem fejeződött be teljesen, ami azt eredményezte, hogy a kialakult bakteroidok nem voltak működőképesek. Ennek következtében a gümők alkalmatlanok voltak a nitrogénkötésre.

A *nodGRP3C* gén ektopikus túltermelését célzó kísérletek – a *LjUBQ10* promóterrel történő ektopikus overexpresszió révén – szintén rendellenes gümőfejlődést eredményeztek. Az érintett gümőkben kezdetben normális bakteroidfejlődés volt megfigyelhető, különösen a differenciációs zónákban és a fertőzési zónákban, ami azt sugallta, hogy a *nodGRP3C* overexpressziója a gümőképződés korai szakaszában nem akadályozza a normális sejtdifferenciálódást. Később azonban a túlzott *nodGRP3C* fehérjeszint degenerációs folyamatokat indított el, valamint sejtszinten jelentős keményítő felhalmozódást, amely amiloplasztok jelenlétével együtt arra utal, hogy a normális anyagcsere-folyamatok sérültek.

A *nodGRP3C* funkciójának és molekuláris hálózatának további feltárása érdekében átfogó transzkriptom elemzéseket végzünk. Ezekkel az elemzésekkel azonosítottuk azokat a géneket, amelyek a *nodGRP3C* expressziójának módosítása során változtak. Az ilyen jellegű genomszintű adatok révén megállapítható a *nodGRP3C* által befolyásolt regulációs hálózat, valamint azok a specifikus útvonalak, amelyek révén ez a fehérje befolyásolja a gümők kialakulását és működését.

A megfigyelt fenotípusok molekuláris háttere jól magyarázható a transzkriptomikai eredményekkel. A *nodGRP3C* OE gümőkben jelentkező szimbiotikus diszfunkció összefügg a

túlzott növényi immunreakcióval. A PR10 fehérjék és defenzinek indukciója a sejtekben valószínűleg programozott sejthalálhoz vezet a gümő szöveteiben, ami a baktériumok korai pusztulását okozza. Ezt támasztja alá, hogy az OE gümőkben erős mitokondrium-degradáció figyelhető meg ultrastrukturális szinten, a szimbiotikus sejtek mitokondriumai összeesettek, kriszta-szerkezetük degradálódott. Az OE gümőkben megfigyelt mitokondriális morfológiai eltérések (ritkább kriszták) funkcionális következményekkel is járhatnak. A hibásan működő mitokondriumokban a citrát belépése a citromsavciklusba akadályozott lehet, ezért a citrát alternatív módon a lipidszintézis irányába terelődik, ami lipidcseppek felhalmozódását eredményezi. Amennyiben a citromsavciklus nem működik megfelelően, elmarad a NADH és FADH₂ képződése, így a légzési lánc proton- és energiaellátása csökken, ami végső soron az ATP-szintézis visszaesését okozhatja. Ez magyarázhatja az OE vonalakban tapasztalt energiahányos állapotot és a gümőfunkciók részleges elégtelenségét. A *nodGRP3C* OE gümők másik feltűnő fenotípusa a keményítőfelhalmozódás, mely szintén értelmezhető a transzkriptomikai adatok alapján. Működő (Fix⁺) gümőkben a növény által biztosított szénforrásokat a bakteroidok a nitrogénkötéshez szükséges energiaforrásként használják fel, így a gümő interzónájában felhalmozódó keményítőraktárakat fokozatosan használják el a nitrogénkötő ZIII-ban. Ezzel szemben a *nodGRP3C* OE gümőkben a gazdasejtekben feleslegben megmaradó cukrok keményítőszemcsékké polimerizálódnak, ami jellemző az ineffektív gümőkre. Fontos kiemelni, hogy mindezek a jelenségek – ROS-termelés, védekezési gének aktivációja, keményítő felhalmozódása – egymással összefüggő folyamatok. A védekezési reakciók aktiválódása miatt a gümősejtek anyagcseréje felborul, a ROS károsítja a mitokondriumokat, csökken az energiafelhasználás a nitrogénkötéshez, emiatt a cukor anyagcsere is torzul és keményítő formájában rakódik le a felesleg. Ezek a molekuláris események végső soron a szimbiózis korai összeomlásához vezetnek.

Összességében megállapítható, hogy a *nodGRP3C* gén optimális kifejeződése elengedhetetlen a nitrogénkötő gümők normális fejlődéséhez és működéséhez. A *nodGRP3C* expressziójában bekövetkező bármilyen zavar – legyen az géncsendesítés vagy ektopikus túltermelés – súlyos szerkezeti és funkcionális rendellenességekhez vezet a gümőkben, ami negatívan befolyásolja a *M. truncatula* és szimbiotikus bakteroidok közötti kapcsolatot. A *nodGRP3C* molekuláris mechanizmusainak és szabályozási hálózatának mélyebb megértése hozzájárulhat a legmodernebb biotechnológiai és agronómiai stratégiák kidolgozásához, amelyek célja a nitrogénkötő folyamatok optimalizálása és a fenntartható mezőgazdasági termelés javítása.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani csoportunk vezetőjének, Prof. Dr. Kondorosi Évának, aki három évvel ezelőtt lehetőséget adott, hogy csatlakozzak a kutatócsoportjához, és együtt dolgozhassunk egy olyan izgalmas témában, amelynek a tudományos jelentőségén túl mezőgazdasági és környezetvédelmi vonatkozásai is vannak. Ez idő alatt lehetőségem nyílt széleskörű metodikai és módszertani ismereteket elsajátítani. Fáradhatatlan munkabírása és motiváltsága pedig nem csupán szakmailag jelent számomra példát, hanem emberileg is. Rendkívül hálás vagyok azért is, hogy a nehéz időszakokban is mellettem állt.

Külön köszönettel tartozom társtémavezetőimnek, Dr. Endre Gabriellának és Dr. Lima Rui Dánielnek. Gabriella precizitása, pontossága és rendkívüli segítőkészsége révén mindig számíthattam támogatására, szakmailag és emberileg egyaránt. Rui értékes módszertani tanácsai, kreatív ötletei és a mikroszkópos vizsgálatok során nyújtott segítsége mellett mindig készséggel válaszolt a kérdéseimre, és támogatóan állt hozzám, amiért különösen hálás vagyok. Ezúton is szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Ábrahám Editnek, akinek munkája és szakmai támogatása alapvető szerepet játszott közös cikkünk létrejöttében.

Köszönöm továbbá Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak a proteomikai kísérletekben nyújtott segítségét, Dr. Domonkos Ildikónak a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) használatának megtanítását, valamint Polgár Tamásnak a transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek elkészítését, és Dr. Laczi Krisztiánnak, hogy segítségemre volt a gázkromatográfiás mérések elvégzésében. Jenei Sándornak köszönöm a gyakorlatias meglátásait, türelmét és praktikus tanácsait.

Köszönöm Dr. Tímár Editnek a konstrukciók elkészítésében és fehérjék termelésében nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Lima Hilda Anikónak a pull-down kísérletekben való közreműködését. Hasonlóképpen köszönöm Mohamad Anas Al Bouni közreműködését és Liptay Zsuzsa segítségét. Külön köszönettel tartozom Dr. Pongor Lőrincnek, aki a transzkriptomikai eredmények bioinformatikai elemzésében nyújtott meghatározó segítséget. Emellett köszönöm a mesterséges intelligencián alapuló ChatGPT eszköz támogatását a szöveg stilisztikai és nyelvi tökéletesítésében.

Végül, de nem utolsósorban köszönetet mondok családomnak, Páromnak és a két Kisfiamnak, akik szeretetükkel és támogatásukkal mellettem álltak. Köszönöm a Nagyszüleimnek és a Keresztanyámnak, nélkülük ma nem lehetnék az, aki vagyok.

IRODALOMJEGYZÉK

- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2019.** SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 420–423.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Alunni B, Kevei Z, Redondo-Nieto M, Kondorosi A, Mergaert P, Kondorosi E (2007)** Genomic organization and evolutionary insights on GRP and NCR genes, two large nodule-specific gene families in *Medicago truncatula*. *MPMI* **20**: 1138–1148
- Berrabah F, Benaceur F, Yin C, Xin D, Magne K, Garmier M, Gruber V, Ratet P (2024)** Defense and senescence interplay in legume nodules. *Plant Communications* **5**: 100888
- Berrabah F, Bernal G, Elhosseyn A-S, El Kassis C, L’Horset R, Benaceur F, Wen J, Mysore KS, Garmier M, Gourion B, és mtsai (2023)** Insight into the control of nodule immunity and senescence during *Medicago truncatula* symbiosis. *Plant Physiol* **191**: 729–746
- Berrabah F, Bourcy M, Cayrel A, Eschstruth A, Mondy S, Ratet P, Gourion B (2014)** Growth conditions determine the *DNF2* requirement for symbiosis. *PLOS ONE* **9**: e91866
- BME Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék. (n.d.).** A nitrogénipar és ammóniagyártás. Elérhető:
http://kkft.bme.hu/attachments/article/42/03_A%20nitrog%C3%A9nipar%20%C3%A9s%20amm%C3%B3niagy%C3%A1rt%C3%A1s.pdf
- Boren J, Brindle KM (2012)** Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death and Differentiation* **19**: 1561
- Bourcy M, Brocard L, Pislariu CI, Cosson V, Mergaert P, Tadege M, Mysore KS, Udvardi MK, Gourion B, Ratet P (2013)** *Medicago truncatula* *DNF2* is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. *New Phytologist* **197**: 1250–1261
- Cabeza R, Koester B, Liese R, Lingner A, Baumgarten V, Dirks J, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Dittert K, Schulze J (2014)** An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **164**: 400–411
- Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C (2012)** Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist* **196**: 548–560
- Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Oláh B, Roudier F, Kondorosi A, Kondorosi E (1999)** The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J* **18**: 4476–4484

- Chen WF, Meng XF, Jiao YS, Tian CF, Sui XH, Jiao J, Wang ET, Ma SJ (2023)** Bacteroid development, transcriptome, and symbiotic nitrogen-fixing comparison of *Bradyrhizobium arachidis* in nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) and medicinal legume *Sophora flavescens*. *Microbiology Spectrum* **11**: e01079-22
- Cheng K, Zhang C, Lu Y, Li J, Tang H, Ma L, Zhu H (2023)** The glycine-rich RNA-binding protein is a vital post-transcriptional regulator in crops. *Plants* **12**: 3504
- Cordoba E, Shishkova S, Vance CP, Hernández G (2003)** Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant J* **33**: 1037–1049
- Cosson V, Durand P, d'Erfurth I, Kondorosi A, Ratet P (2006)** *Medicago truncatula* transformation using leaf explants. *Methods Mol Biol* **343**: 115–127
- Cosson V, Eschstruth A, Ratet P (2015)** *Medicago truncatula* transformation using leaf explants. In K Wang, ed, *Agrobacterium Protocols: Volume 1*. Springer, New York, NY, pp 43–56
- Czernic P, Gully D, Cartieaux F, Moulin L, Guefrachi I, Patrel D, Pierre O, Fardoux J, Chaintreuil C, Nguyen P, és mtsai (2015)** Convergent evolution of endosymbiont differentiation in Dalbergioid and Inverted Repeat-Lacking Clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiology* **169**: 1254–1265
- diCenzo GC, Zamani M, Ludwig HN, Finan TM (2017)** Heterologous complementation reveals a specialized activity for BacA in the *Medicago–Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *MPMI* **30**: 312–324
- Downie JA, Kondorosi E (2021)** Why should nodule cysteine-rich (NCR) peptides be absent from nodules of some groups of legumes but essential for symbiotic N-fixation in others? *Front Agron*. doi: 10.3389/fagro.2021.654576
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR (1992)** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod Factors. *Science* **256**: 998–1000
- Erisman JW, Sutton M, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W (2008)** How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience - NAT GEOSCI* **1**: 636–639
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV, Becana M (1996)** Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiol* **110**: 1187–1195
- Farkas A, Maróti G, Dürdő H, Györgypál Z, Lima RM, Medzihradszky KF, Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi É (2014)** *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *PNAS* **111**: 5183–5188
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, és mtsai (2013)** The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20130164

- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280–300
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E** (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049–1051
- Galloway J, Dentener F, Boyer E, Howarth R, Seitzinger S, Asner G, Cleveland C, Green P, Holland E, Karl D, és mtsai** (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**: 153–226
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA** (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**: 889–892
- Gallusci P, Dedieu A, Journet EP, Huguet T, Barker DG** (1991) Synchronous expression of leghaemoglobin genes in *Medicago truncatula* during nitrogen-fixing root nodule development and response to exogenously supplied nitrate. *Plant Mol Biol* **17**: 335–349
- Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty JF, Moran JF, Becana M** (1997) N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiology* **113**: 1193–1201
- Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Becana M** (1995) Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiology* **108**: 753–759
- González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C** (1998) Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1705–1714
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131**: 872–877
- Griesmann M, Chang Y, Liu X, Song Y, Haberer G, Crook MB, Billault-Penneteau B, Lauresergues D, Keller J, Imanishi L, és mtsai** (2018) Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science*. doi: 10.1126/science.aat1743
- Gu Z, Eils R, Schlesner M** (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**: 2847–2849
- Guefrachi I, Nagymihaly M, Pislariu CI, Van de Velde W, Ratet P, Mars M, Udvardi MK, Kondorosi E, Mergaert P, Alunni B** (2014) Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**: 712
- Guefrachi I, Verly C, Kondorosi É, Alunni B, Mergaert P** (2015) Role of the bacterial BacA ABC-transporter in chronic infection of nodule cells by Rhizobium bacteria. *Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 315–324

- Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, Longhi R, Boncompagni E, Héroutart D, Dall’Angelo S, és mtsai** (2011) Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLOS Biology* **9**: e1001169
- Hakoyama T, Niimi K, Watanabe H, Tabata R, Matsubara J, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Jichun L, Matsumoto T, és mtsai** (2009) Host plant genome overcomes the lack of a bacterial gene for symbiotic nitrogen fixation. *Nature* **462**: 514–517
- Hartmann LS, Barnum SR** (2010) Inferring the evolutionary history of mo-dependent nitrogen fixation from phylogenetic studies of *nifK* and *nifDK*. *J Mol Evol* **71**: 70–85
- Hassen AI, Lamprecht SC, Bopape FL** (2020) Emergence of β -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume-rhizobium host specificity dogma. *World J Microbiol Biotechnol* **36**: 40
- He J, Benedito VA, Wang M, Murray JD, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK** (2009) The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**: 441
- Horváth B, Domonkos Á, Kereszt A, Szűcs A, Ábrahám E, Ayaydin F, Bóka K, Chen Y, Chen R, Murray JD, és mtsai** (2015) Loss of the nodule-specific cysteine rich peptide, *NCR169*, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* *dnf7* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 15232–15237
- Horváth B, Güngör B, Tóth M, Domonkos Á, Ayaydin F, Saifi F, Chen Y, Biró JB, Bourge M, Szabó Z, és mtsai** (2023) The *Medicago truncatula* nodule-specific cysteine-rich peptides, *NCR343* and *NCR-new35* are required for the maintenance of rhizobia in nitrogen-fixing nodules. *New Phytologist* **239**: 1974–1988
- Karmakar, K., Kundu, A., Rizvi, A. Z., Dubois, E., Severac, D., Czernic, P., Cartieaux, F., & DasGupta, M.** (2019). Transcriptomic analysis with the progress of symbiosis in ‘crack-entry’ legume *Arachis hypogaea* highlights its contrast with ‘infection thread’ adapted legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 32(3), Article 3. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-18-0174-R>
- Kebede E** (2021) Contribution, utilization, and improvement of legumes-driven biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Front Sustain Food Syst*. doi: 10.3389/fsufs.2021.767998
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML** (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1229–1244
- Kereszt A, Mergaert P, Montiel J, Endre G, Kondorosi É** (2018) Impact of Plant Peptides on Symbiotic Nodule Development and Functioning. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2018.01026
- Kevei Z, Vinardell JM, Kiss GB, Kondorosi A, Kondorosi E** (2002) Glycine-Rich Proteins Encoded by a Nodule-Specific Gene Family Are Implicated in Different Stages of Symbiotic Nodule Development in *Medicago* Spp. *MPMI* **15**: 922–931

- Kim M, Chen Y, Xi J, Waters C, Chen R, Wang D** (2015) An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *PNAS* **112**: 15238–15243
- Kondorosi E, Banfalvi Z, Kondorosi A** (1984) Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. *Molec Gen Genet* **193**: 445–452
- Kondorosi E, Kondorosi A** (2004) Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters* **567**: 152–157
- Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A** (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology* **67**: 611–628
- Kotogány E, Dudits D, Horváth GV, Ayaydin F** (2010) A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods* **6**: 5
- Krishnakumar V, Kim M, Rosen BD, Karamycheva S, Bidwell SL, Tang H, Town CD** (2015) MTGD: The *Medicago truncatula* genome database. *Plant Cell Physiol* **56**: e1
- Larrainzar E, Villar I, Rubio MC, Pérez-Rontomé C, Huertas R, Sato S, Mun J-H, Becana M** (2020) Hemoglobins in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *New Phytologist* **228**: 472–484
- Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowski MF** (2005) Evolutionary rates analysis of leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Systematic Biology* **54**: 575–594
- Lima RM, Kylarová S, Mergaert P, Kondorosi É** (2020) Unexplored arsenals of legume peptides with potential for their applications in medicine and agriculture. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2020.01307
- Liu J, Rasing M, Zeng T, Klein J, Kulikova O, Bisseling T** (2021) NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol* **230**: 290–303
- Lorenzo C, Lucas MM, Vivo A, de Felipe MR** (1990) Effect of nitrate on peroxisome ultrastructure and catalase activity in nodules of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1573–1578
- Love MI, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550
- Łotocka B, Kopcińska J, Skalniak M** (2012) Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis Phila Pa* **58**: 63–72
- Mangeon A, Junqueira R, Sachetto-Martins G** (2010) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant signaling & behavior* **5**: 99–104

- Maróti G, Downie JA, Kondorosi É** (2015) Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 57–63
- Maróti G, Kondorosi É** (2014) Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology* **5**:
- Marx H, Minogue CE, Jayaraman D, Richards AL, Kwiecien NW, Siahpirani AF, Rajasekar S, Maeda J, Garcia K, Del Valle-Echevarria AR, és mtsai** (2016) A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nat Biotechnol* **34**: 1198–1205
- Masuda T, Inomura K, Takahata N, Shiozaki T, Sano Y, Deutsch C, Prášil O, Furuya K** (2020) Heterogeneous nitrogen fixation rates confer energetic advantage and expanded ecological niche of unicellular diazotroph populations. *Commun Biol* **3**: 1–12
- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol* **121**: 97–112
- Maunoury N, Redondo-Nieto M, Bourcy M, Van de Velde W, Alunni B, Laporte P, Durand P, Agier N, Marisa L, Vaubert D, és mtsai** (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**: e9519
- Mergaert P, Nikovics K, Kelemen Z, Maunoury N, Vaubert D, Kondorosi A, Kondorosi E** (2003) A Novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology* **132**: 161–173
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset A-E, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, és mtsai** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium–legume symbiosis. *PNAS* **103**: 5230–5235
- Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M** (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology* **25**: 811–817
- Millonig G** (1961) A modified procedure for lead staining of thin sections. *J Biophys Biochem Cytol* **11**: 736–739
- Montiel J, Downie JA, Farkas A, Bihari P, Herczeg R, Bálint B, Mergaert P, Kereszt A, Kondorosi É** (2017a) Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *PNAS*. doi: 10.1073/pnas.1704217114
- Morandi D, Prado E, Sagan M, Duc G** (2005) Characterisation of new symbiotic *Medicago truncatula* (Gaertn.) mutants, and phenotypic or genotypic complementary information on previously described mutants. *Mycorrhiza* **15**: 283–289

- Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu M-H, Oldroyd GED, Poole PS, és mtsai** (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* **82**: 3698–3710
- Nagymihály M** (2017) Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. doi: 10.14232/phd.4084
- Nouwen N, Arrighi J-F, Cartieaux F, Chaintreuil C, Gully D, Klopp C, Giraud E** (2017) The role of rhizobial (*NifV*) and plant (*FEN1*) homocitrate synthases in *Aeschynomene* /photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. *Scientific Reports* **7**: 448
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 519–546
- Oono R, Schmitt I, Sprent JI, Denison RF** (2010) Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytologist* **187**: 508–520
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C** (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**: 417–419
- Pérez Guerra JC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, Van De Velde W, Goormachtig S, Holsters M** (2010) Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **152**: 1574–1584
- Pimentel H, Bray NL, Puente S, Melsted P, Pachter L** (2017) Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat Methods* **14**: 687–690
- Pladys D, Vance CP** (1993) Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiol* **103**: 379–384
- Prell J, Poole P** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* **14**: 161–168
- Raul, B., Bhattacharjee, O., Ghosh, A., Upadhyay, P., Tembhare, K., Singh, A., Shaheen, T., Ghosh, A. K., Torres-Jerez, I., Krom, N., Clevenger, J., Udvardi, M., Scheffler, B. E., Ozias-Akins, P., Sharma, R. D., Bandyopadhyay, K., Gaur, V., Kumar, S., & Sinharoy, S.** (2022). Microscopic and transcriptomic analyses of dalbergoid legume peanut reveal a divergent evolution leading to nod-factor-dependent epidermal crack-entry and terminal bacteroid differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(2), Article 2. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-21-0122-R>
- Reynolds ES** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208–212
- Richardson KC, Jarett L, Finke EH** (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* **35**: 313–323
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140

- Rostas K, Kondorosi E, Horvath B, Simoncsits A, Kondorosi A** (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1757–1761
- Roudier F, Fedorova E, Lebris M, Lecomte P, Györgyey J, Vaubert D, Horvath G, Abad P, Kondorosi A, Kondorosi E** (2003) The Medicago Species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiol* **131**: 1091–1103
- Roux B, Rodde N, Jardinaud M-F, Timmers T, Sauviac L, Cottret L, Carrère S, Sallet E, Courcelle E, Moreau S, és mtsai** (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* **77**: 817–837
- Sagan M, Morandi D, Tarengi E, Duc G** (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after γ -ray mutagenesis. *Plant Science* **111**: 63–71
- Sankari, S., Babu, V. M. P., Bian, K., Alhhazmi, A., Andorfer, M. C., Avalos, D. M., Smith, T. A., Yoon, K., Drennan, C. L., Yaffe, M. B., Lourido, S., & Walker, G. C.** (2022). A haem-sequestering plant peptide promotes iron uptake in symbiotic bacteria. *Nature Microbiology*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01192-y>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, és mtsai** (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682
- Seabra AR, Pereira PA, Becker JD, Carvalho HG** (2012) Inhibition of glutamine synthetase by phosphinothricin leads to transcriptome reprogramming in root nodules of *Medicago truncatula*. *MPMI* **25**: 976–992
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR** (2009) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry* **78**: 701–722
- Sinharoy S, Torres-Jerez I, Bandyopadhyay K, Kereszt A, Pislariu CI, Nakashima J, Benedito VA, Kondorosi E, Udvardi MK** (2013) The C2H2 Transcription Factor REGULATOR OF SYMBIOSOME DIFFERENTIATION represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **25**: 3584–3601
- Smil V** (2002) Eating meat: evolution, patterns, and consequences. *Population and development review* **28**: 599–639
- Snow J** (2014) The environmental, elemental and proteomic plasticity of *Trichodesmium* in the (sub) tropical atlantic.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG** (1995) Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *PNAS* **92**: 2647–2651

- Starker CG, Parra-Colmenares AL, Smith L, Mitra RM, Long SR** (2006) Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Physiol* **140**: 671–680
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000).** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
- Sumiahadi A, Acar R** (2020) Green manure for soil properties improvement.
- Swaraj K, Laura JS, Bishnoi NR** (1993) Nitrate induced nodule senescence and changes in activities of enzymes scavenging H₂O₂ in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* Taub.). *Journal of Plant Physiology* **141**: 202–205
- Timmers ACJ, Soupène E, Auriac M-C, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G** (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant-Microbe Interactions* **13**: 1204–1213
- Tirichine L, de Billy F, Huguet T** (2000) Mtsym6, a gene conditioning *Sinorhizobium* strain-specific nitrogen fixation in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **123**: 845–852
- Vanstraelen M, Baloban M, Da Ines O, Cultrone A, Lammens T, Boudolf V, Brown SC, De Veylder L, Mergaert P, Kondorosi E** (2009) APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 11806–11811
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G** (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**: 4295–4306
- Van de Velde W, Guerra JCP, Keyser AD, Rycke RD, Rombauts S, Maunoury N, Mergaert P, Kondorosi E, Holsters M, Goormachtig S** (2006) Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**: 711–720
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A, Tiricz H, és mtsai** (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122–1126
- Velzen R van, Doyle JJ, Geurts R** (2019) A Resurrected scenario: single gain and massive loss of nitrogen-fixing nodulation. *Trends in Plant Science* **24**: 49–57
- Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P, Kondorosi A, és mtsai** (2003) Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* **15**: 2093–2105
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG** (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications* **7**: 737–750

- Wang D, Griffiths J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T, Long S** (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**: 1126–1129
- Wang L, Tian T, Deng Y, Ji J, Liang J, Guan Y, Li R, Huang X, Wang Y, Ning G, és mtsai** (2025) Plant glutamyl-tRNA reductases coordinate plant and rhizobial heme biosynthesis in nitrogen-fixing nodules. *The Plant Cell* **37**: koaf095
- Wen L, Chen Y, Schnabel E, Crook A, Frugoli J** (2019) Comparison of efficiency and time to regeneration of *Agrobacterium*-mediated transformation methods in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* **15**: 20
- Wycoff K** (1998) Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in Alfalfa. *PLANT PHYSIOLOGY* **117**: 385–395
- Xi J, Chen Y, Nakashima J, Wang S, Chen R** (2013) *Medicago truncatula esn1* defines a genetic locus involved in nodule senescence and symbiotic nitrogen fixation. *MPMI* **26**: 893–902
- Xiao TT, Schilderink S, Moling S, Deinum EE, Kondorosi E, Franssen H, Kulikova O, Niebel A, Bisseling T** (2014) Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**: 3517–3528
- Yang WC, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T** (1994) Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **6**: 1415–1426
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KFX, Gouzy J, Schoof H, és mtsai** (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520–524
- Yu W, Dai Y, Chen J, Liang A, Wu Y, Suo Q, Chen Z, Yan X, Wang C, Lai H, és mtsai** (2024) Upregulation of the glycine-rich protein-encoding gene *GhGRPL* enhances plant tolerance to abiotic and biotic stressors by promoting secondary cell wall development. *Journal of Integrative Agriculture* **23**: 3311–3327
- Zhang Y, Chen L, Dai T, Sun R, Wen D** (2015) Ammonia manipulates the ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the coastal sediment-water microcosms. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 6481–6491
- Zhou Y, Wang L, Rubio MC, Pérez-Rontomé C, Zhou Y, Qi Y, Tian T, Zhang W, Fan Q, Becana M, és mtsai** (2023) Heme catabolism mediated by heme oxygenase in uninfected interstitial cells enables efficient symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *New Phytologist* **239**: 1989–2006

ÖSSZEFOGLALÁS

A pillangósvirágú növények és a talajlakó rhizobium baktériumok szimbiotikus kapcsolata a gyökérgümők kialakulásához vezet, melyekben a baktériumok képesek a levegő nitrogénjét ammóniává redukálni. *M. truncatula* modellnövényben a nitrogénkötés hatékonyságát és a gümők élettartamát számos tényező befolyásolja, beleértve a növény által szekretált gümőspecifikus peptideket. Kutatásunk célja a szimbiotikus gümők idő előtti öregedésének (korai szeneszenciájának) vizsgálata, valamint egy kiválasztott gümőspecifikus glicinben gazdag fehérje, a *nodGRP3C* gén funkciójának jellemzése volt. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy az általunk vizsgált mutánsokban (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36, TR36) az eredménytelen (nitrogénkötésre képtelen, Fix^-) szimbiózisokban közös jelenség a gümők korai öregedése. Továbbá, hogy a *nodGRP3C* gén kritikus szerepet játszik a normál gümőfejlődés fenntartásában.

Korai gümőszenezscencia Fix^- mutáns gümőkben

Különböző genetikai hibákkal rendelkező *M. truncatula* Fix^- mutánsokat vizsgáltunk (*dnf4*, *dnf7-2*, TRV36, TR36, TR183), amelyek mind nitrogénkötésre képtelen gümőket fejlesztenek. Valamennyi ilyen mutánsvonalban a gümők már jóval a normális ~4 hetes élettartam előtt degenerálódni kezdtek. A vad típusú növényekben a gümők folyamatosan növekedtek és 21 napig életképesek maradtak, ezzel szemben a Fix^- mutánsok gümőinek növekedése 1-2 hét után leállt, és hamarosan a szimbiotikus sejtek pusztulásának jelei mutatkoztak. A gümők mérete kisebb maradt, a nitrogenáz aktivitást jelző *nifH promóter::GUS* expresszió pedig korán lecsökkent ezekben a mutánsokban. Mikroszkópos elemzéseink azt mutatták, hogy minden Fix^- mutáns gümőben a normálisan megnyúlt, differenciált bakteroidok fokozatosan eltűntek, helyüket pedig kisméretű, szaprofitikus jellegű baktériumok vették át. Ennek a folyamatnak az időpontja mutatott különbséget, mivel a *dnf4*, *dnf7-2*, és TR183 mutánsok esetében ez a fertőzést követően már 17 nappal megfigyelhető volt, a TRV36 és TR36 mutánsok esetében későbbi időpontban, a fertőzést követő 21. napnál.

A korai szeneszenciát morfológiai és sejtelettani jellemzők kísérték. Már 7 napos korban több mutáns gümőben lezárult a gázcserét szabályozó endodermisz réteg a gümő csúcsán, ami gátolhatja a gümő további növekedését. Ezzel összefüggésben a merisztéma működése idő előtt leállt, a sejtosztódási és endoreduplikációs aktivitás drasztikusan csökkent a Fix^- gümőkben. Áramlási citometriás vizsgálataink megerősítették, hogy a mutáns gümőkben a magas

ploidiaszámú (8C feletti) sejtmagok aránya jelentősen kisebb a vad típushoz viszonyítva, jelezve az endoreduplikációs ciklusok korai leállítását. A gümők rózsaszín színét adó leghemoglobin fehérje mennyisége is zavart szenvedett: a *dnf4*, *dnf7-2* és TR183 mutánsokban a leghemoglobin génjeinek (*Lb2*, *Lb3*) mRNS-szintje és fehérjeterméke már 2-3 héten belül drasztikusan lecsökkent. Ezzel szemben a késleltetett gümőfejlődést mutató TR36 és TRV36 vonalakban a leghemoglobin expresszió kezdetben alacsony volt, majd fokozatosan emelkedett, ami korrelált a szenescencia késleltetett megjelenésével.

Molekuláris szinten kiderült, hogy a korai gümőöregedésben a proteolitikus enzimek fokozott aktivitása játszik központi szerepet. A Fix^- mutánsok gümőiben az öregedés korai markereinek tartott cisztein-proteáz gének (*CP2*, *CP6*), valamint más lebontó enzimek (*chitinase 2*, *purple acid phosphatase 22*) transzkripciója már 7–11 napos korban szignifikánsan megnőtt. Ugyanakkor a szimbiózis fenntartásához szükséges gének (*NIN*, *SymCRK*, *RSD*, *DNF2*) expressziója nem emelkedett a mutáns gümőkben – sőt, több esetben alacsonyabb volt a vad típushoz képest. A védekezési válaszokat jelző *PR10.1* gén sem mutatott indukciót a korai szenescencia során. Mindez azt jelzi, hogy a Fix^- gümők pusztulását nem a gazdanövény immunválasza váltja ki, hanem a gümő saját, fejlődési szenescencia programja aktiválódik túlzott mértékben. A nitrogénkötés leállása, a bakteroidok korai lebomlása és a szenescencia-markerek idő előtti expressziója általános jelenségnek bizonyult a vizsgált mutánsokban, függetlenül attól, hogy milyen génhiba okozta a Fix^- fenotípust. Ez a közös kimenetel arra utal, hogy ha a szimbiózis működése zavart szenved, a növény szinte mindig a gümőfejlődési program lezárásával és a szövetek lebontásával reagál.

A *nodGRP3C* gén szerepe a szimbiotikus gümőfejlődésben

A gümőspecifikus glicin-gazdag fehérjéket kódoló *nodGRP* géncsalád tagjai a *M. truncatula* gümőkben kifejeződő kisméretű (50–100 aminosavas), szekréciós peptidek, amelyek pontos funkciója eddig kevésbé volt ismert. Különösen a *nodGRP3C* (*Medtr2g069245*) gént emeltük ki vizsgálatainkban, mivel korábbi transzkriptomikai adatok alapján ez a gén már a korai gümőfejlődés során, az infekciós zóna alsóbb rétegeiben (ZIIp) erősen expresszálódik. Feltételezésünk szerint a *nodGRP3C* fehérje fontos szerepet tölthet be a korai bakteroid-differenciáció szabályozásában és a szimbiózis fenntartásában. A *nodGRP3C* peptid egy 98 aminosav hosszú, erősen pozitív töltésű (izoelektromos pont ~10,4) fehérje, amely egy N-terminális szignál szekvenciából és egy glicinben gazdag C-terminális doménből áll. E szerkezeti jellemzők arra utalnak, hogy a *nodGRP3C* a szimbiotikus folyamat során a

szekréciós útvonalon a bakteroidok környezetébe jut, ahol kölcsönhatásba léphet a baktériumokkal.

A *nodGRP3C* funkciójának felderítésére génmódosítással hoztunk létre *M. truncatula* transzgenikus vonalakat. Antiszensz (géncsendesítő) konstrukcióval ~50%-kal csökkentettük a *nodGRP3C* gén kifejeződését a gümőkben. Ennek hatására a gümők fejlődése súlyosan károsodott: a *nodGRP3C* hiányában a gümők kisméretűek, gömbölyűek és fehér színűek maradtak, bennük pedig drasztikusan lecsökkent a fertőzött (szimbiotikus) sejtek aránya. A *nodGRP3C* nélkül a szimbiózis csak kezdetlegesen indult be, bár a baktériumok behatoltak a sejtekbe és megnyúlásnak indultak, a differenciáció nem fejeződött be. A konfokális mikroszkópos elemzések kisebb bakteroid-sejteket mutattak ki az antiszensz gümőkben, mint a kontrollban, továbbá a bakteroidok életképessége csökkent (sok elhalt bakteroidot figyeltünk meg). Ennek következtében a *nodGRP3C*-csendesített gümők nem voltak képesek nitrogénkötésre. Mindez arra utal, hogy a *nodGRP3C* gén normál működése nélkülözhetetlen a szimbiózis fennmaradásához.

A *nodGRP3C* funkció túlzott fokozását is tanulmányoztuk ektopikus túltermelő (OE, overexpressziós) vonalak létrehozásával. Az *LjUBQ10* konstitutív promóter alá helyezett *nodGRP3C* gén bevitelével létrehozott stabil transzformáns OE növények külsőleg egészségesek voltak, és gümőik kezdetben normálisnak tűntek. A fertőzés korai szakaszában a rhizobiumok bejutottak a gyökérgümőkbe és megkezdődött a differenciációjuk, jelezve, hogy a túlzott *nodGRP3C* jelenléte eleinte nem gátolja a gümőképződést. A gümők fejlődésének későbbi fázisában azonban súlyos rendellenességek jelentkeztek, az OE gümőkben a fertőzött sejtek idő előtt degradálódtak. Mikroszkópos vizsgálatok a mitokondrium membránjainak torzulását, a bakteroidok szétesését, a sejtekben pedig kórosan sok keményítőszemcsét (amiloplasztot) mutattak ki, ami az anyagcsere súlyos zavarára utal. Transzkriptomikai elemzéseink rávilágítottak, hogy a *nodGRP3C* OE gümőkben számos védelmi és stresszválasz gén (pl. *PR10* patogén-fehérje, defenzin) kórosan magas szinten fejeződik ki, ami hiperszenzitív immunválaszt és programozott sejthalált válthat ki a gümő szövetében. Az OE gümők ultrastruktúrájában ennek megfelelően az intenzív sejthalál jeleit figyeltük meg, a szimbiotikus sejtek mitokondriumai összeestek és lebomlottak.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a *nodGRP3C* egy újonnan azonosított, kulcsfontosságú szabályozó eleme a nitrogénkötő gümők fejlődésének. Normál szinten szükséges a megfelelő bakteroid-differenciációhoz és a gümő tartós fennmaradásához, ugyanakkor túlzott mennyiségben káros, mert immunválasz-szerű folyamatokat indít be. A *nodGRP3C* tehát hozzájárul az egyensúly fenntartásához a gazdanövény és a rhizobium

baktérium együttműködésében. Kutatásunk segíthet megérteni, miként illeszkedik ez a fehérje a gümőfejlődés komplex molekuláris mechanizmusába, és felveti annak lehetőségét, hogy a *nodGRP3C* modulálásán keresztül a jövőben befolyásoljuk a szimbiózis hatékonyságát.

SUMMARY

The symbiotic interaction between legumes and *Rhizobium* bacteria represents one of the most remarkable examples of a mutually beneficial plant–microbe association. During this process, rhizobia colonize legume roots and initiate the formation of specialized organs, called root nodules. These nodules provide a protected niche where bacteria differentiate into bacteroids capable of reducing atmospheric nitrogen into ammonia, which is then assimilated by the plant. In return, the plant provides photosynthetically derived carbon sources to support bacterial metabolism. This symbiotic nitrogen fixation significantly contributes to global nitrogen cycling and reduces the need for synthetic fertilizers, making it an ecologically and agriculturally important process.

In *M. truncatula*, a widely used model legume, the success and efficiency of symbiotic nitrogen fixation depend on a finely tuned developmental program, which coordinates nodule organogenesis, infection thread progression, and bacteroid differentiation. However, several genetic or physiological defects may compromise this program, leading to ineffective nodules (Fix⁻), which are incapable of fixing nitrogen. Such nodules often undergo premature senescence, a process that drastically limits their lifespan and function. While natural senescence is a developmentally regulated event marking the end of nodule function after weeks of activity, early senescence in Fix⁻ nodules represents a failure of symbiosis and an activation of degradation pathways long before the natural termination point. Understanding the triggers and molecular regulators of this process is crucial, since early senescence is a major factor limiting nitrogen fixation efficiency.

The present dissertation addresses two central objectives. First, we aimed to characterize early senescence in a set of *M. truncatula* Fix⁻ mutants with different genetic backgrounds, in order to reveal common and divergent features of nodule degeneration. Second, we sought to investigate the function of a specific nodule-expressed glycine-rich protein gene, *nodGRP3C*, whose expression pattern suggested a role in bacterial infection and differentiation. By combining histological, cytological, molecular, and transgenic approaches, we provide novel insights into the molecular mechanisms that regulate nodule stability and lifespan.

Early nodule senescence in Fix⁻ mutants

A panel of *M. truncatula* mutants defective in symbiotic nitrogen fixation was analyzed, including the *dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TR36V and TR36 mutants. Despite their diverse genetic

defects, all lines developed Fix⁻ nodules that failed to sustain nitrogen fixation and underwent premature senescence. Whereas wild-type nodules continued to grow for three weeks post-inoculation and remained functional for up to four weeks, mutant nodules ceased growth within 1–2 weeks and displayed accelerated cell death.

Histological and reporter gene analyses provided detailed insights into this process. In wild type, expression of the *nifH promoter::GUS* construct confirmed sustained nitrogenase activity throughout the functional stages of nodule development. In contrast, Fix⁻ nodules exhibited an early decline in *nifH::GUS* expression, consistent with the failure of effective symbiosis. Microscopy revealed that elongated, differentiated bacteroids gradually disappeared, replaced by small, undifferentiated bacterial cells resembling free-living saprophytes.

Although all mutants shared this premature senescence phenotype, the timing of degeneration varied. In *dnf4*, *dnf7-2* and TR183, hallmarks of cell death were detectable as early as 17 dpi, whereas in TR36 and TRV36 senescence occurred around 21 dpi. Despite these differences, the ultimate outcome was the same: the collapse of the symbiotic zone and the loss of nitrogen-fixing activity.

Premature nodule senescence was associated with a series of morphological and cytological changes. In several mutants, the apical endodermal barrier closed as early as 7 dpi, preventing further oxygen diffusion and nodule expansion. Consequently, meristematic activity declined rapidly, accompanied by a sharp reduction in cell division and endoreduplication. Flow cytometry confirmed that the proportion of highly polyploid nuclei (>8C) was markedly reduced compared to wild type, indicating the early cessation of endoreduplication cycles.

Another hallmark of early senescence was the disruption of leghemoglobin accumulation. In wild-type nodules, leghemoglobins (*Lb2* and *Lb3*) accumulate to provide the red coloration typical of functional nodules. In Fix⁻ mutants, this accumulation was strongly impaired. In *dnf4*, *dnf7-2*, and TR183, leghemoglobin transcript levels and protein abundance declined dramatically within 2–3 weeks. In TR36 and TRV36, leghemoglobin expression was initially low but increased later, consistent with their delayed senescence phenotype. These findings link hemoglobin metabolism to the developmental regulation of nodule longevity.

At the molecular level, early senescence correlated with the induction of proteolytic and degradative pathways. Cysteine proteases (*CP2*, *CP6*) and other hydrolases (*chitinase 2*, *purple acid phosphatase 22*) showed strongly elevated expression in Fix⁻ nodules as early as 7–11 dpi. By contrast, key regulators of symbiosis maintenance (*NIN*, *SymCRK*, *RSD*, *DNF2*) did not increase, and in some mutants were even downregulated compared to wild type. Interestingly, defense-related genes such as *PR10.1* were not induced, suggesting that premature senescence

does not represent a pathogen-triggered immune response, but rather the misactivation of an intrinsic developmental senescence program.

Collectively, these results reveal that diverse genetic defects converge on a common outcome: when symbiotic nitrogen fixation fails, nodules are systematically terminated by the host plant. This indicates that early senescence is not an incidental phenomenon but a robust, conserved developmental response to symbiotic failure.

Functional analysis of *nodGRP3C*

Beyond the characterization of Fix^- mutants, we explored the role of *nodGRP3C*, a member of the nodule-specific glycine-rich protein family. Transcriptomic data had revealed strong expression of this gene in the infection zone of nodules (ZIIp), suggesting a role during early bacteroid differentiation. The encoded peptide is a 98 amino acid, highly cationic protein (pI ~10.4) with an N-terminal signal sequence and a glycine-rich C-terminal domain, pointing to its localization to the symbiotic interface between the plant and the bacteroid.

To examine its function, we generated transgenic lines with reduced or enhanced *nodGRP3C* expression. In the antisense (AS) lines, *nodGRP3C* transcript abundance decreased by <50%, resulting in severely defective nodules. These nodules remained small and white, with few infected cells. Although bacteria entered host cells, differentiation was arrested and nitrogen fixation did not occur. Confocal microscopy revealed smaller, less viable bacteroids, highlighting the essential role of *nodGRP3C* in supporting bacteroid differentiation and survival.

Overexpression (OE) lines were also established using the *LjUBQ10* promoter. Interestingly, initial stages of nodule development appeared normal, indicating that elevated *nodGRP3C* did not interfere with early infection. However, during later stages OE nodules exhibited severe abnormalities, including premature degradation of infected cells, collapsed membranes, disrupted bacteroids, and excessive starch accumulation. Transcriptome analyses revealed strong upregulation of stress and defense genes such as *PR10* and defensins, consistent with immune-like activation and programmed cell death. Ultrastructural analysis confirmed widespread mitochondrial collapse and cell death in symbiotic cells.

These findings highlight the dual role of *nodGRP3C*, while essential at physiological levels, its overproduction disrupts cellular homeostasis and induces metabolic imbalance. Thus, *nodGRP3C* is a critical regulator of the balance between plant and bacteroids.

Conclusions and perspectives

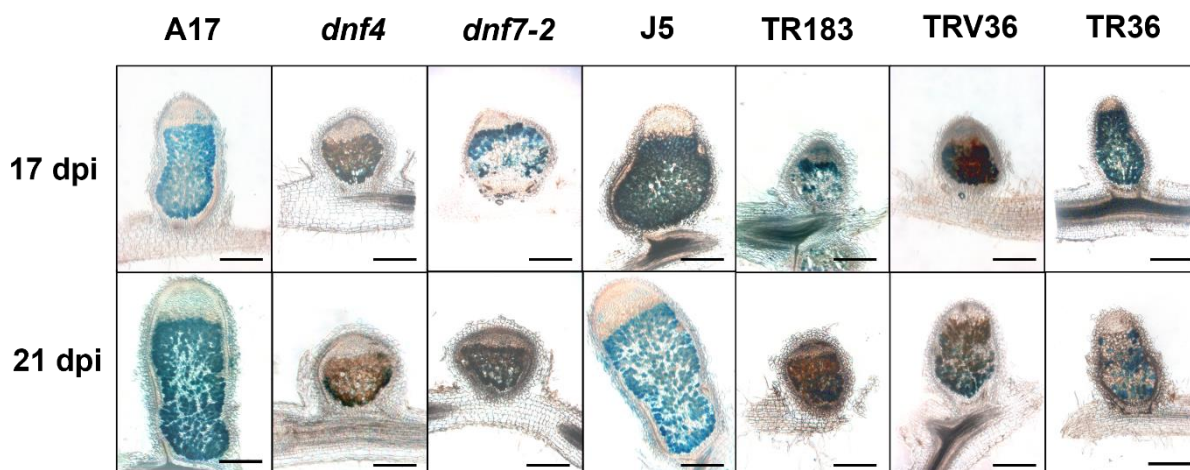
In summary, this dissertation provides two major advances in our understanding of legume–rhizobium symbiosis:

1. Early senescence as a common outcome of symbiotic failure: Diverse Fix^- mutants consistently undergo premature nodule termination, regardless of the underlying genetic defect. This demonstrates that early senescence represents a general developmental response of the host to ineffective symbiosis.
2. *NodGRP3C* as a novel regulator of nodule development. Functional analyses reveal that *nodGRP3C* is indispensable for successful bacterial differentiation and sustained nitrogen fixation. However, its overexpression perturbs symbiotic balance, inducing cell death and metabolic abnormalities.

Together, these findings emphasize that the regulation of nodule lifespan depends on a delicate equilibrium between developmental, metabolic, and molecular pathways. By identifying *nodGRP3C* as a key regulatory element and characterizing early senescence as a conserved developmental program, this work advances our understanding of symbiotic stability and efficiency. Future efforts to modulate such regulators may contribute to enhancing biological nitrogen fixation and reducing dependence on synthetic fertilizers in sustainable agriculture.

FÜGGELÉKEK

1. Függelék. Kiegészítő 1. ábra A *PnifH::GUS* riportergén aktivitásának GUS-festése vad típusú és *Fix*⁻ mutáns gümőkben.



Kiegészítő 1. ábra. Hisztokémiai GUS-festés vad típusú (A17, J5) és *Fix*⁻ mutáns (*dnf4*, *dnf7-2*, TR183, TRV36 és TR36) növények gümőinek hosszmetsetein, a fertőzést követő 17. és 21. napon (dpi). Méretarány: 0,5 mm.

2. Függelék. Primerlista

Gén	Génazonosító	Forward primer	Reverse primer	Referencia
<i>CP2</i>	<i>Medtr5g022560</i>	CATCTTACCCTA CTGCTTAAATGC	AACTAGAAACCATGAT GAATGTAGC	Pérez Guerra és mtsai., 2010
<i>CP6</i>	<i>Medtr4g079800</i>	GCAATGATGGC ATCTTATCCC TTTTGCACCGGA	TACACAAGCATAATCA CAATTTAC CCAACACCACTACCCA	Pérez Guerra és mtsai., 2010
<i>PAP22</i>	<i>Medtr7g104360</i>	TTCTTCAC CATTTCATCAAC	AGGA TTGTTGGATTTCAGCTCC	Xi és mtsai., 2013
<i>chitinase</i>	<i>Medtr6g079630</i>	CCATGTTGG CGGTTCTGAGAC	AATG GGCACCTCTGCACCTT	Xi és mtsai., 2013
<i>NIN</i>	<i>Medtr5g099060</i>	AATACTTTGC GAAAGATGGAA TACACCCAAAA	GAACAG AACTTGACCTGGGTCG	RT-qPCR
<i>RSD</i>	<i>Medtr7g063220</i>	CC GATTTCTGTGTT	TCAGA ACATCAGAAGTGAAC	Berrabah és mtsai., 2023
<i>symCRK</i>	<i>Medtr3g079850</i>	GAAGCTTGGCT AGGCAATGCGT	CTCTGCAA CGACACCGAACTGAGA	Berrabah és mtsai., 2023
<i>Dnf2</i>	<i>Medtr4g085800</i>	TCAGAAGGCCT CACGATTCATCG	TAGTCA GGGTTGGAACCAATT	Berrabah és mtsai., 2023
<i>PR10.1</i>	<i>Medtr4g120970</i>	AGAAAGCA CCGCAAGGACT	GAAC TATCGGTCCATTCTGGA	Berrabah és mtsai., 2023
<i>40S</i>	<i>Medtr3g013635</i>	GTTCAAGAT CCTTCCTTCTAT	AGC CATGGGTGGCTTGACT	Nagymihály és mtsai., 2017
<i>cyclinA2</i>	<i>Medtr2g102520</i>	GATTGCTGCAT TTGGCTGTTGGT	GATCT GTTCCAACAGCAAGAT	Pellizzaro és mtsai., 2014.
<i>ccs52A</i>	<i>Medtr4g102510</i>	TTGGGTAAC TTGGGAAGTAG	GAGTA CCAAATTTAACCCATT	Kuppusamy és mtsai., 2004.
<i>Lb2</i>	<i>Medtr1g011540</i>	CCTATGATGCA TGGAATGGTAC	GCCTTCT CCCAAAGTAGCATCTC	RT-qPCR
<i>Lb3</i>	<i>Medtr5g081000</i>	GCGATTACAG AGGGGGAAAGT	CCAATACT CCACCACCTCCCATCTT	RT-qPCR
<i>nodGRP1L</i>	<i>Medtr5g084260</i>	GATGGAAAC AGACTGGGGAG	TC TTTGCACCTTTTTCATG	RT-qPCR
<i>nodGRP3A</i>	<i>Medtr2g069273</i>	GCTCATTTT TGTTCTTTATTT	TGC TGGATGACTCGATTAC	RT-qPCR
<i>nodGRP3C</i>	<i>Medtr2g069245</i>	GTGCCCTAATTC T	CACAAT CCTCCTATCAAAAACC	RT-qPCR
<i>nodGRP4</i>	<i>Medtr5g081590</i>	GGGAACGTCCA AGAGAAAGA	CTTCG CGCTCTAGAATG	RT-qPCR
<i>nodGRP3C</i> OE	<i>Medtr2g069245</i>	AAAATTAAACC TTTTATC	CCGGGTACCTCATGGA AGTCGTCCTC	GRP3C túltermelés, XbaI-Acc65I

3. Függelék. A bakteroid differenciáció leállásának kvantitatív elemzése a gümőkben

A17

7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás

0-2 µm	10,9	1,7	2,6	0,8	5,2	1,1	4,1	0,9	5,8	0,8
2-4 µm	15,3	2,2	14,3	2,2	11,0	1,6	12,9	1,5	10,7	1,6
4-6 µm	40,8	2,9	36,4	3,3	37,5	4,0	37,1	2,4	35,7	1,2
6-8 µm	30,6	3,0	34,3	3,9	39,3	4,1	38,7	4,6	40,7	7,9
8-10 µm	2,4	0,6	11,0	2,8	6,1	2,2	6,4	1,1	6,6	0,6
> 10 µm	0	0,0	1,4	0,7	0,9	0,8	0,8	0,3	0,4	0,4
>2 µm	89,1		97,4		94,8		95,9		94,1	

Jemalong 5

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás
0-2 µm	12,9	2,0	5,9	1,2	1,0	0,5	2,5	0,5	1,6	0,4
2-4 µm	19,9	3,1	8,4	1,9	9,1	1,8	5,0	1,2	4,8	1,3
4-6 µm	32,4	4,5	26,1	3,1	32,1	1,5	33,8	1,4	35,4	6,6
6-8 µm	29,9	2,8	43,8	4,8	46,7	6,3	44,7	5,3	43,9	3,2
8-10 µm	4,9	0,5	15,3	4,2	10,5	3,1	12,8	2,8	13,2	1,3
> 10 µm	0	0,0	0,5	0,5	0,7	0,1	1,2	0,5	1,1	1,0
>2 µm	87,1		94,1		99,1		97,5		98,4	

dnf4

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás
0-2 µm	11,8	1,7	12,8	3,3	33,8	3,3	79,4	11,2	96,5	3,0
2-4 µm	21,7	3,0	22,0	3,0	28,9	4,7	10,9	2,4	2,4	0,9
4-6 µm	39,2	4,4	34,8	1,6	25,4	3,1	7,1	1,4	1,1	0,6
6-8 µm	24	4,2	26,9	2,6	10,0	1,2	2,6	0,7	0,0	0,0
8-10 µm	3,3	1,1	3,5	0,7	1,9	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
> 10 µm	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
>2 µm	88,2		87,2		66,2		20,6		3,5	

dnf7-2

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás
0-2 µm	15,7	3,3	13,5	3,2	35,8	6,3	67,7	8,5	96,0	1,6
2-4 µm	23,2	4,6	31,3	2,8	29,0	2,9	11,0	1,0	2,8	0,5
4-6 µm	38,5	2,3	31,1	3,2	25,7	2,7	10,1	0,8	1,2	0,5
6-8 µm	20,4	1,6	21,9	4,6	9,0	1,3	9,1	2,2	0,0	0,0
8-10 µm	2,2	0,7	2,2	0,4	0,5	0,4	2,1	0,6	0,0	0,0
> 10 µm	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
>2 µm	84,3		86,5		64,2		32,3		4,0	

TR36

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás
0-2 µm	10,8	1,8	6,0	1,7	9,0	1,1	24,0	3,4	71,6	6,6
2-4 µm	22,5	2,8	13,9	1,2	13,3	1,9	25,8	4,4	11,0	2,2
4-6 µm	33	4,4	44,3	4,9	40,9	4,5	35,0	2,6	10,5	3,1
6-8 µm	28,5	3,5	31,3	4,8	33,7	3,6	12,0	2,0	5,9	1,5
8-10 µm	5,1	1,8	4,5	0,9	3,1	0,7	3,0	1,1	1,0	0,9
> 10 µm	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
>2 µm	89,1		94,0		91,0		75,8		28,4	

TRV36

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás	átlag (összesen)	szórás
0-2 µm	31,9	3,9	11,0	1,7	13,2	2,4	44,7	6,3	88,5	5,6
2-4 µm	23	3,2	25,5	4,9	30,8	4,6	29,0	1,9	7,5	1,1
4-6 µm	26,7	1,6	39,8	3,0	36,0	1,7	18,2	2,4	3,0	0,8
6-8 µm	16,5	4,0	18,0	3,9	18,0	2,9	8,0	1,7	1,0	0,9
8-10 µm	1,9	0,7	2,0	0,3	2,0	0,6	0,1	0,2	0,0	0,0
> 10 µm	0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
>2 µm	68,1		85,4		86,8		55,3		11,5	

TR183

	7 dpi		10 dpi		15 dpi		17 dpi		21 dpi	
	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás	átlag (összesen %)	szórás
0-2 µm	9,2	1,6	14,1	1,6	37,2	3,4	68,7	5,9	93,2	3,2
2-4 µm	18,7	1,6	25,6	4,9	25,0	3,2	16,8	2,0	4,3	0,9
4-6 µm	47,1	4,4	32,6	3,4	24,8	1,7	13,0	2,8	2,1	0,5
6-8 µm	23,6	3,5	23,3	2,7	11,0	2,2	1,5	0,6	0,4	0,4
8-10 µm	1,4	1,2	4,4	1,3	2,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
> 10 µm	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
>2 µm	90,8		85,9		62,8		31,3		6,8	

4. Függelék. A gümőkől izolált sejtmagok DNS-tartalmának kvantitatív elemzése

7 dpi	A17			dnf4			dnf7-2		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	21,9	1,8	3	19,3	0,9	3	17,6	1,5	3
4C	55,0	0,3	3	56,5	0,8	3	55,7	2,6	3
8C	10,7	0,6	3	12,3	0,7	3	12,4	1,0	3
16C	4,2	1,6	3	4,6	1,1	3	4,9	1,6	3
32C	5,3	1,6	3	4,1	0,4	3	6,0	1,4	3
64C	2,8	2,3	3	3,1	2,6	3	3,5	3,1	3
>8C	12,4			11,8			14,3		

7 dpi	J5			TR183			TRV36			TR36		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	18,1	0,1	3	20,0	1,4	3	20,1	2,6	3	20,6	0,5	3
4C	54,6	2,3	3	55,2	1,0	3	57,5	2,4	3	54,1	1,6	3
8C	13,3	1,2	3	12,4	0,6	3	12,9	0,2	3	12,3	0,6	3
16C	5,1	0,7	3	4,5	1,6	3	4,3	1,2	3	4,9	1,2	3
32C	5,5	1,0	3	5,0	1,3	3	3,4	0,3	3	5,4	1,1	3
64C	3,4	3,0	3	2,9	3,3	3	1,9	0,8	3	2,7	2,7	3
>8C	13,9			12,4			9,5			13,1		

11 dpi	A17			dnf4			dnf7-2		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	14,1	1,0	3	15,0	1,0	3	13,5	1,5	3
4C	60,2	2,9	3	60,4	1,9	3	63,6	2,2	3
8C	10,7	0,4	3	11,1	0,9	3	12,1	0,5	3
16C	5,4	1,4	3	5,1	1,6	3	4,3	1,7	3
32C	5,8	1,0	3	5,2	0,5	3	4,3	0,7	3
64C	3,8	4,3	3	3,2	3,5	3	2,2	2,4	3
>8C	14,9			13,6			10,7		

11 dpi	J5			TR183			TRV36			TR36		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	15,3	0,4	3	14,8	3,1	3	14,7	5,6	3	18,9	1,4	3
4C	59,3	2,3	3	64,1	3,6	3	62,7	4,8	3	56,6	2,2	3
8C	11,3	0,9	3	12,2	0,3	3	10,0	0,8	3	9,8	0,8	3
16C	5,3	1,9	3	4,2	1,3	3	3,9	1,7	3	4,5	1,6	3
32C	5,5	1,1	3	3,4	0,3	3	4,8	1,1	3	5,6	1,1	3
64C	3,4	4,1	3	1,4	1,9	3	3,9	3,1	3	4,6	5,2	3
>8C	14,1			8,9			12,6			14,7		

15 dpi	A17			dnf4			dnf7-2		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	10,0	0,5	3	18,5	2,3	3	18,2	1,0	3
4C	63,4	4,1	3	64,9	3,4	3	66,3	1,2	3
8C	10,4	1,9	3	11,5	0,3	3	10,9	1,2	3
16C	5,3	3,2	3	3,1	0,5	3	2,8	0,4	3
32C	5,2	1,8	3	1,2	0,8	3	1,3	1,0	3
64C	5,7	7,5	3	0,6	0,6	3	0,4	0,5	3
>8C	16,2			5,0			4,5		

15 dpi	J5			TR183			TRV36			TR36		
	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N	átlag	szórás	N
2C	10,9	0,4	3	18,2	2,9	3	12,9	5,8	3	17,9	1,6	3
4C	60,5	4,0	3	64,8	3,1	3	63,6	3,5	3	59,9	2,5	3
8C	10,4	1,3	3	12,4	0,4	3	9,4	0,8	3	10,3	0,6	3
16C	5,4	1,9	3	2,9	0,6	3	5,2	3,2	3	4,8	1,6	3
32C	7,3	2,2	3	1,2	0,3	3	5,0	1,3	3	4,5	0,3	3
64C	5,4	6,8	3	0,5	0,2	3	3,9	2,9	3	2,6	2,3	3
>8C	18,1			4,7			14,0			11,8		

5. Függelék A transzkriptomikai kísérlethez felhasznált vonalak és csoportosításuk

Minta neve (ábráknak megfelelően)	Csoport	Genotípus/vonal	Forrásazonosító(k)
control 10	control	R108	R108/8
control 11	control	R108	R108/22+23
control 12	control	R108	R108/3
GRP3C OE 1	GRP3C OE	R108	25/3; 25/4
GRP3C OE 2	GRP3C OE	R108	26/3; 26/5
GRP3C OE 4	GRP3C OE	R108	13/8; 24/20; 25/2
GRP3C RNAi 3	GRP3C RNAi	G2	G2 2a/2/22
GRP3C RNAi 13	GRP3C RNAi	G2	G2 1a/2/5
GRP3C RNAi 14	GRP3C RNAi	G2	G2 1a/2/4

6. Függelék A disszertációban bemutatott transzkriptomikai vizsgálatok teljes eredménye (nyers adatok, normalizált expressziós értékek és differenciális génexpressziós listák) a dolgozat terjedelmi korlátai miatt nem kerültek közvetlenül csatolásra.

Az adatok szabadon letölthetők az alábbi linken keresztül:

https://www.dropbox.com/scl/fi/a48qemk9ufu2vebb5q344/6sz_fuggelek.docx?rlkey=0jm7f3i2x0j6m1pmaxc8s0omy&st=yp1wkk8p&dl=0