



SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS SZAK, MSC.
SZINT, NAPPALI TAGOZAT

SZIMBIOTIKUS NITROGÉNKÖTÉSBEN HIBÁS *MEDICAGO*
***TRUNCATULA* MUTÁNSOK VIZSGÁLATA**

Készítette:
Fodor Lili

Belső témavezető:
Dr. Szőke Antal
Egyetemi adjunktus
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Külső témavezető:
Dr. Kaló Péter
Tudományos főmunkatárs
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Gödöllő
2013.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A nitrogén körforgása és a biológiai nitrogénkötés	8
2.1.1. Szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása	10
2.1.2. Rhizobium baktériumok	12
2.2. Medicago truncatula, mint modellnövény	13
2.3. A szimbiózisban szerepet játszó jelcserék a növény és a mikroba között	14
2.4. A szimbiotikus gümő	15
2.5. A szimbiotikus nitrogénkötés folyamatában szerepet játszó növényi gének vizsgálata genetikai eszközökkel	18
2.5.1. FNB (Fast Neutron Bombardment)	19
2.5.2. Genetikai térképezés	19
2.5.2.1. Színtérképezés	20
3. CÉLKITŰZÉS	23
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	24
4.1. Növényi anyagok	24
4.1.1. Növényi anyag eredete és nevelése	24
4.1.2. A növények fertőzése rhizobium baktériummal	24
4.1.3. Növények keresztezése	25
4.2. Mikroszkópos vizsgálatokhoz használt anyagok és módszerek	25
4.2.1. Gümőmetszet készítése	25
4.2.2. Gümőmetszetek festése	26

4.2.2.1.	X-Gal festés.....	26
4.2.2.2.	Toluidinkék festés.....	27
4.3.	Molekuláris genetikai anyagok és módszerek	27
4.3.1.	DNS kivonás	27
4.3.2.	Molekuláris genetikai markerek és felhasznált primerek	27
4.3.3.	Polimeráz láncreakció.....	27
4.3.3.1	Kolónia PCR.....	29
4.3.3.2.	Primerek tesztelése	29
4.3.4.	PCR termékek klónozása és szekvenálása	29
4.3.5.	Szintérkép színekódjai.....	30
5.	EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	31
5.1.	<i>Medicago truncatula</i> szimbiotikus mutánsok vizsgálata	31
5.2.	A mutáns lókuszek kromoszómális helyzetének megállapítása	34
	<i>A mutáns lókuszek és ismert szimbiotikus fenotípusok allélvizsonyainak vizsgálata ..</i>	38
5.2.1.	NF-FN9199 mutáns allélteszt eredménye.....	38
5.2.2	Az NSP2 gén szekvenciájának meghatározása az NF-FN9199 mutáns háttérben 40	
5.2.3.	NF-FN9285 mutáns allélteszt eredménye.....	41
5.3.	Az NF-FN9285 mutáns növény további morfológiai vizsgálatata és összehasonlítása a <i>dnf2</i> és 13U mutánsokkal.....	43
5.3.1.	Az NF-FN9285 mutáns növény gümőmorfológiája.....	44
5.4.	Az NF-FN9285 mutáns növény genetikai térképezése	47
	ÖSSZEFOGLALÁS	51
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	53
	IRODALOMJEGYZÉK.....	54
	MELLÉKLETEK	57

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Amp - ampicillin

CCaMK - Ca^{2+} -**cal**modulin dependent protein **k**inase

CCRH - Colonized curled root **h**air

cM - centimorgan

DMI 1/2/3 - does not **make** infection 1/2/3

DNF - defective in **n**itrogen **f**ixation

DNS – **D**eoxi-ribo**n**ukleinsav

E.coli - *Escherichia coli*

EMS - etil-**metán**-szulfonát

ENOD (**early nodulin**) korai nodulin gének

ERN – ERF required for nodulation (ERF transcription factor)

Fix - nitrogen **f**ixation

LacZ - β -galaktozidáz gén

NOD - (**nodulin**) nodulin gének

M. truncatula - *Medicago truncatula*

NF - Nod **f**aktor

NF-FN - Noble **F**oundation-**F**ast **N**eutron

NFP - Nod **f**actor **p**erception

NFR - Nod factor receptor

NSP – Nodulin signalling pathway

PBS - (Phosphate Buffered Saline) foszfát puffer

PCR – (Polymerase Chain Reaction) Polimeráz láncreakció

rpm - percenkénti fordulatszám

TAE puffer - Tris-acetate-EDTA puffer

S. medicae, **Sm** - *Sinorhizobium medicae*

X-Gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1. BEVEZETÉS

Az élővilágban nagyon sok példát találunk arra, hogy két élőlény szimbiózisban él egymással. A szimbiózis gyakori példája, hogy egy magasabb rendű élőlény mikroorganizmusokkal él kölcsönösen előnyös kapcsolatban. Gondoljunk csak a kérődzőkre, melyek a bendőbaktériumaik és bendőprotozoáik nélkül képtelenek lennének megfelelően emésztetni. Ráadásul a különböző bendőmikrobák egymással is szimbiózisban élnek, mert egyik faj fermentációs terméke a másik energiaforrását jelenti (<http://>). Az ember emésztőrendszerében is milliárdnyi hasznos baktérium él, melyek az emésztést segítik, vitaminokat állítanak elő, és ha a bélflóra egyensúlya nem borul fel, más kórokozók elszaporodását gátolják meg. Mezőgazdaságilag és ökológiailag a legfontosabb szimbiózisok a mikorrhiza gombák és nitrogénkötő baktériumok kölcsönhatása a növényekkel.

A legtöbb magasabb rendű növény képes arbuszkuláris mikorrhiza (AM), - vagyis a mikorrhiza legelterjedtebb és valószínűleg legősibb formáját alkotó gombáival szimbiózis- kialakítására. A gomba hifái áthatolnak a növény gyökerének kéregsejtjeinek sejtfalán és ún. arbuszkulumokat hoznak létre, melyek szerteágazó képletek, a növény és a gomba közötti tápanyagcsere fő helyszínei. A szimbiózis során a növény ásványi anyagokat (főleg foszfort és nitrogént) és vizet kap a gombától, a gomba pedig kész szerves anyagokat a növénytől.

Nitrogénkötő baktériumokkal való endoszimbiózis létrehozására azonban csak néhány növénycsalád tagjai képesek. Ezek közül a leginkább tanulmányozott terület a pillangósvirágúak (*Fabaceae*) és talajlakó gram-negatív baktériumok (rhizobiumok) között kialakuló szimbiózis. A „rhizobium” gyűjtőneve az *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* és *Sinorhizobium* nemzetségekbe tartozó baktériumoknak. Ez az interakció egy egészen új szerv, a gyökérgümő kialakulásához vezet a növényen. A gümő sejtjein belül (intracellulárisan) találhatók meg a baktériumok, melyek a légköri nitrogént megkötik és ez a növény számára felhasználható formává alakítják. A szimbiózis kialakulásának lépéseit molekuláris párbeszéd kíséri végig a növény és a baktérium között, mely kommunikáció szükséges ahhoz, hogy a növény a mikroorganizmus jelenlétére megfelelően reagáljon.

Bár a növényi válaszreakció a rhizobiumok és az AM esetben eltérő, a jelátviteli útvonalban közös vonások figyelhetők meg. Sőt, az interakció első lépéseiben ugyanazok a gének játszanak szerepet. Mivel a pillangósvirágúak mind mikorrhiza, mind rhizobia szimbiózis kialakítására is képesek, elsőrendű alanyai mindkét szimbiotikus kapcsolat vizsgálatának. A molekuláris háttér megértéséhez vezető úton nagy segítséget jelentenek a *Lotus japonicus* és a *Medicago truncatula* pillangós modellnövények (Limpens & Bisseling 2003).

A pillangósvirágú növények, amellet, hogy a fent említett tulajdonságaik miatt nagy jelentőséggel bírnak a tudományos kutatás szempontjából, az egyik legfontosabb növénycsaládnak számítanak a mezőgazdaságban is. Jelentős fehérje- és olajforrást jelentenek, emellett pedig nitrogénnel dúsítják a talajt. Ugyanannyi nitrogént kötnek meg a Földön a baktériumokkal szimbiózisban, mint amennyi nitrogén műtrágyát az ipar előállít. A szója (*Glycine max*) a világ olajtermelésének több mint 50%-át biztosítja, a lucerna (*Medicago sativa*) pedig igen fontos takarmánynövény (R Cook 1999).

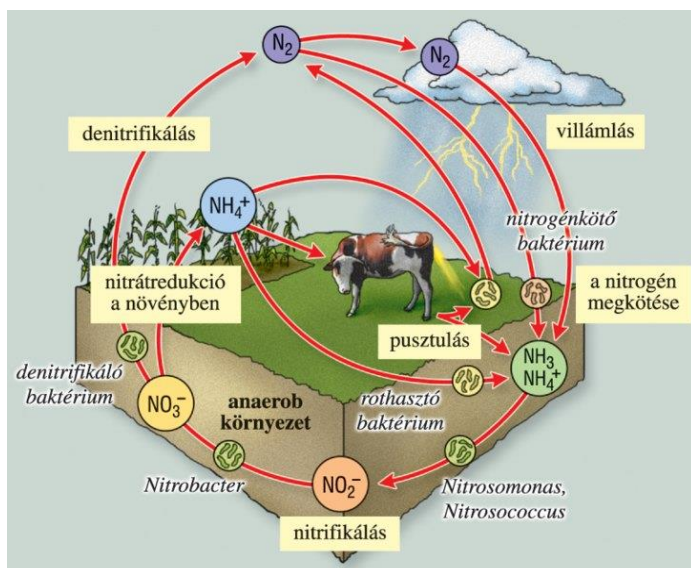
Angol kutatók tették fel azt a kérdést, hogy milyen közel állunk a nitrogénkötésre képes gabonák mezőgazdasági alkalmazásához? 2050-re a Föld lakossága elérheti a 9 milliárdot, mely szükségessé teszi, hogy egyre több és több élelmiszert tudjunk előállítani. Nitrogénkötő baktériumokkal való szimbiózis kialakítására képes gabonák kifejlesztésével elméletileg növelhető lenne a terméshozam és csökkenne a műtrágyázási igény. A mikorrhiza jelátviteli útvonal kezdeti elemei megtalálhatóak a gabonákban, mely útvonal hasonló a rhizobium jelátviteli útvonalához, így megvalósítható lehet ez a futurisztikus elképzelés. Ehhez azonban alaposan meg kell ismerni a növény-rhizobium interakció minden lépését és minden szimbiotikus gént (Charpentier & Oldroyd 2010).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A nitrogén körforgása és a biológiai nitrogénkötés

A nitrogén a növények számára legfontosabb három makroelem (nitrogén, foszfor, kálium) egyike. Az atmoszférában, semleges N_2 gáz formájában, minden hektár felett kb. 80 ezer tonna nitrogén található, amíg a természetes és mesterséges ökoszisztémák (azaz a termesztett és természetes növények fogyasztása) átlagban 150 kg nitrogén évente hektáronként. A levegő 78 térfogatszázalékát nitrogén teszi ki, azonban a legtöbb élőlény ezt ilyen formában nem tudja felhasználni. Bizonyos kékmosztafajok, ill. nitrogénkötő baktériumok felveszik a levegőből a nitrogént, és ammóniává alakítják, melyből utána ammónium-ion lesz. Az ammónium-ionok végső soron aminosavakká alakulnak.

Az elpusztult élőlények (növények, állatok) teteme a talajba kerül, ahol korhasztó, rothasztó baktériumok élnek. Ezek tevékenysége folytán a nitrogéntartalmú vegyületekből ammóniagáz (NH_3) keletkezik. Az ammónia egy része a talajból távozik, de keletkezhet belőle ammónium-ion (NH_4^+) és nitrit-ion (NO_2^-), ill. nitrát-ion (NO_3^-) is. Az ammónium-ion keletkezésekor az ammónia vízzel reagál. A nitrifikáló baktériumok hatására lesz az ammóniából NO_2^- , ill. abból NO_3^- . Az említett ionokat a növények fel tudják venni. A villámlások a nitrogénből ugyancsak nitrit- és nitrát-ionokat tudnak létrehozni, melyek vízzel reagálva savas eső formájában jutnak a talajba. Élnek a talajban denitrifikáló baktériumok is, amelyek a nitrogéntartalmú ionokat visszaalakítják elemi nitrogénné, amely a légkörbe távozik (1. ábra). Ez a növények többsége szempontjából nem túl szerencsés lépés, hiszen számukra az elemi nitrogén felvehetetlen. Szerencsére ezek a denitrifikáló baktériumok csak anaerob körülmények között aktívak, így a szántás, ill. a talajművelés során a talajba bekerülő oxigén jelentősen csökkenti számukat (http2)



1. ábra: A nitrogén körforgása a természetben (http3).

A nitrogén megkötése alatt általában a semleges, légköri nitrogén (N_2 – dinitrogén) átalakítását értjük az élőlények számára elérhető (biodisponibilis) formákká. A nitrogén megkötése tehát történhet nem biológiai úton, iparilag, kémiai reakciókkal vagy elektromos kisülések révén az atmoszférában (villámlás) és biológiai úton, szimbiotikus és nem szimbiotikus nitrogénkötés révén. Ez utóbbi történhet talajban vagy vízben és a nitrogén ammóniává való redukálásából áll. Ebben a folyamatban résztvevő fontosabb mikroorganizmusok a következők: *Azotobacter*, *Azomonas* és *Cyanobacterium*. Szimbiotikus nitrogénkötésre csupán néhány baktérium nemzetség és fajta képes, így a rhizobia, frankia baktériumok (ez utóbbiak nem pillangósvirágúakkal alakítanak ki szimbiózist), valamint *Phyllobacterium*, *Ochrobacterum*, és *Methylobacterium* nemzetség néhány tagja. A legjelentősebb ezek közül a rhizobia baktériumok és pillangósvirágú növények közt kialakuló endoszimbiózis, mely diplomadolgozatom témájának alapjául is szolgál. Az endoszimbiózis azt jelenti, hogy a baktérium a növényen belül, annak sejtjeiben él, s így alakul ki a kölcsönösen előnyös együttélés. Ez a szimbiózis leghatékonyabb formája.

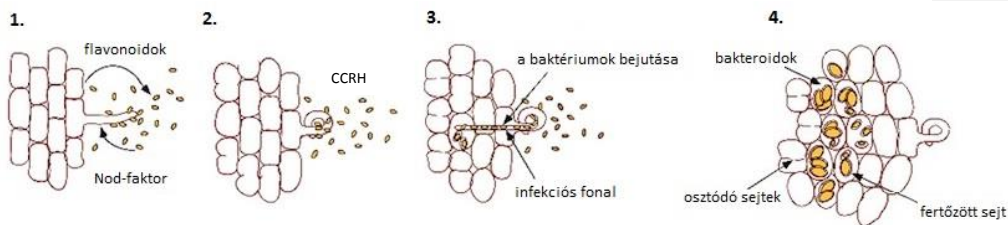
2.1.1. Szimbiotikus nitrogénkötés kialakulása

A talajban rengeteg mikroorganizmus él, de a növényi gyökerek sejtfaa védőpajzsként szolgál a kártékony mikrobák ellen. A pillangósvirágú növény gyökere és rhizobium baktériumok között azonban jelcserét követően a mikroba képes bejutni a növény belső szöveteibe és elárasztani annak sejtjeit, melynek eredményeképpen egy új növényi szerv, a szimbiotikus gümő alakul ki. Mindkét fél számára hasznos az együttélés, mivel a gümő belsejében élő rhizobium baktériumok a növénytől származó tápanyagok energiájának segítségével képesek a légköri nitrogéngázt ammóniává redukálni, melyet a növény nitrogénforrásként fel tud használni.

A növény és a szimbionta baktérium között létrejövő párbeszéd első eleme a növény által termelt flavonoidok (2-fenil-1,4-benzopiron származékok), melyet a gyökér közelében (a rizoszférában) lévő baktériumok érzékelnek és válaszreakcióként ún. Nod faktort kezdenek kiválasztani, melynek hatására a növényben összetett válaszreakció indul meg, felkészülve a baktérium befogadására. A flavonoidok a baktérium egy transzkrípciót szabályozó ún. NodD fehérjéhez kapcsolódva aktiválják a bakteriális nodulációs (*nod*) géneket, melyek termékei felelősek a bakteriális jel molekula, a Nod faktor (NF) termeléséért. A NF egy lipochitooligoszacharid típusú molekula, melynek alapstruktúráját a bakteriális *nodABC* operon kódolja. Más *nod* gének (valamint *noe* és *nol* gének) módosítják és különböző ligandokat (szulfát, acetilsoport, stb.) illesztenek az alapvázra, biztosítva a NF gazdaspecifitását. A rhizobium baktériumok és a Nod faktor számos növényi gént, köztük sok gümőspecifikus, ún. nodulin gént aktivál. Ezeket a géneket két nagy csoportra oszthatjuk. Egyik csoport a korai nodulin gének (early nodulin: *ENOD*). Ezek a gének nagyon hamar (órákon belül) aktiválódnak NF kezelés vagy rhizobium fertőzés hatására, azonban később, a gümő fejlődése során is gyakran mutatnak aktivitást. Ezzel ellentétben a késői nodulin gének (*NOD*) a fertőzést követően több nappal kezdenek expresszálni. Valószínűleg az *ENOD* gének a baktériumhoz való alkalmazkodásban és a kölcsönhatás kialakításában, a késői nodulin gének pedig a gümő működésében (Oldroyd 2007) játszanak szerepet.

A Nod faktorra adott egyik első növényi válaszreakció a gyökérszőrök intracelluláris terében való kalcium szint megnövekedése (mely arbuszkuláris mikorrhiza szimbioziséknél is megfigyelhető <Ott & Pott 2011>). A baktériumok megtapadnak a gyökérszőrön, melynek vége begömböly, mert a növekedési pont a gyökércsúcsról áthelyeződik a baktériumokkal szembeni

oldalra. Így kialakul az ún. CCRH (Colonized curled root hair, vagyis fertőzött, begömbült gyökérszőr). A begömbült gyökérszőr „magába zárja” a hozzá tapadt baktériumokat (2. ábra). Miután ez megtörtént, kialakul egy invaginációs befűződés, az ún. infekciós fonál, mely a gyökérszőr belsejében fut, és amelyen keresztül a baktériumok bejutnak a gyökér belső sejtszövegeihez. Mindeközben a fertőzési ponttól több sejtszövegi távolságra, a gyökér belső kéregsejtjei közül pár visszanyeri mitotikus aktivitását és osztódni kezdenek létrehozva a gümőkezdemény (gümőprimordium) sejtjeit. A fertőzés után néhány nappal a gyökér felszínén kidudorodás jelenik meg, és ennek merisztematikus zónájában sokszorososan elágazódó infekciós fonalak figyelhetők meg. Később a legtöbb fiatal gümősejtben infekciós fonál végződik, és ezeket a sejteket előzönlük a baktériumok. (Jones et al. 2007)



2. ábra: A fertőződés menetének sematikus ábrája. (http4): 1: Kémiai felismerés a növény és a baktérium között 2: A baktériumok megtapadnak a gyökérszőrön, ami bekunkorodik és ezzel egy időben megindul a belső sejtek osztódása (gümőprimordium). 3: Az infekciós fonál kialakul, a baktériumok ezen keresztül bejutnak a belső sejtekhez. 4: A gümő kezd kialakulni, a baktériumok pedig bakteroiddá válnak.

Többféle NOD fehérje létezik, illetve sok rhizobium fajta képes több Nod faktor termelésére is egy időben (Jones et al. 2007), azonban nagyfokú specificitás figyelhető meg a szimbiózis kialakulásánál, ugyanis csak bizonyos fajta rhizobium baktérium képes kapcsolatba lépni bizonyos fajta pillangósvirágú növényvel. Ezt a specificitást a baktérium NF-a határozza meg, hiszen más-másféle NF-t termelnek nem csak a különböző rhizobium fajták, de akár az egy fajtához tartozó egyedek is. Csak a megfelelő partner növény képes felismerni a baktérium szignál molekuláit (Oldroyd 2007, Jones et al 2007). A korai növényi válaszreakciókat (gyökérszőr deformációt, primordium és infekciós fonál kialakulásának kezdetét) baktériumok jelenléte nélkül, tisztított Nod faktor molekulákkal is ki lehet váltani.

A nitrogénkötés hatékonysága egy növényen belül a baktériumtól függően elég változatos lehet. A növény még azelőtt választja meg szimbionta partnerét, mielőtt az elkezdene nitrogént kötni. Az, hogy a növény mely baktériummal lép szimbionta kapcsolatba, nem függ a rhizobium baktérium tényleges nitrogénkötő képességeitől. Ez a „naiv”, tökéletlen szelekció a növény részéről megadja a lehetőséget a fertőzésre és gümőképződésre olyan baktériumok számára is, melyek nagyon gyengén vagy egyáltalán nem képesek nitrogénkötésre, és csupán, mint egy parazita élnek a növény akár teljesen kifejlett gümőiben. Ezek az ingyenélők mindenhol megtalálhatóak és komoly problémákat okoznak a gazdák számára olyan gazdaságilag fontos növények termesztésénél is, mint a bab vagy szója. A pillangósvirágúak filogenetikájában sokszor találkozhatunk olyan esettel, hogy egy növény egyáltalán nem képez gümőt. Ez arra enged következtetni, hogy talán az, hogy a növény egyáltalán nem alakít ki szimbiózist, még mindig kifizetődőbb lehet, mint áldozatául esni ilyen csalóknak. De tapasztalták már a növény bizonyos fokú szelekcióját is, például folytonosan osztódó merisztéma szövettel rendelkező gümőnél sok esetben megfigyelhető volt, hogy a merisztéma sejtek felhagynak az osztódással, ha a baktériumok gyenge nitrogénkötőnek bizonyulnak (Den Herder & Parniske 2009).

2.1.2 *Rhizobium* baktériumok

A rhizobium baktériumok talajlakó baktériumok, melyek a pillangósvirágú növényeken egy különleges szerv, a gümő létrehozását indukálják. A rhizobiumok a gümőkön belül, a sejtekben, a citoplazmától elkülönülve bakteroidokká alakulnak, felkészülve a megváltozott életkörülményekre és anyagcserére, képessé válnak a légköri nitrogén megkötésére.

A rhizobia baktériumok osztályozása még ma is folyamatban van. A legelső kísérletek a baktériumok elnevezésére a gazdanövényük alapján történt. Később Fred és munkatársai (1932) megalkották a *Rhizobium* nemzetségnevet és azt javasolták, hogy az osztályozás történjen a baktérium gümőképzési formája alapján, kihangsúlyozva a gazdanövényt. A '60-as években Norris (1965) a rhizobiumokat biokémiai tulajdonságaik alapján csoportosította, de ennek a megközelítésnek meg voltak a hiányosságai. A '70-es években a szekvenálási módszerek kidolgozása megalapozta a mai napig használatos osztályozási módszereket. A konzerválódott DNS régiók, gének vagy génszakaszok felismerésével világossá vált, hogy ezek –és főleg a 16S rRNS- a legjobb markerek a baktériumok közti kapcsolatok felderítésére. Az 1984-ben megjelent bakterológiai kézikönyv (Krieg & Holt 1984) még csak két rhizobia nemzetséget (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*) tartalmazott négy fajjal. Azóta sok más genotípusú és fenotípusú

variációt írtak le. A szekvenálási technikák és a PCR technológia megjelenése új nemzetségek leírásához és a meglévők újragondolásához vezetett (Sahgal & Johri 2006). 2003-ig 36 rhizobium faj oszlott meg hét nemzetség között. 2007-re 44 gümőképző baktériumot ismertek 11 nemzetségben (Sahgal & Johri 2006). Egy újabb, 2012-es publikáció szerint azonban nem csak a „jól ismert” rhizobium baktériumok képesek nitrogénkötésre. 11 nemzetség 56 baktérium faja bizonyult eddig szimbióta nitrogénkötőnek, köztük a *Phyllobacterium*, *Ochrobacterum*, és *Methylobacterium* nemzetség néhány tagja, melyeket eddig szimbiózisra alkalmatlannak tartottak (Huang et al. 2012).

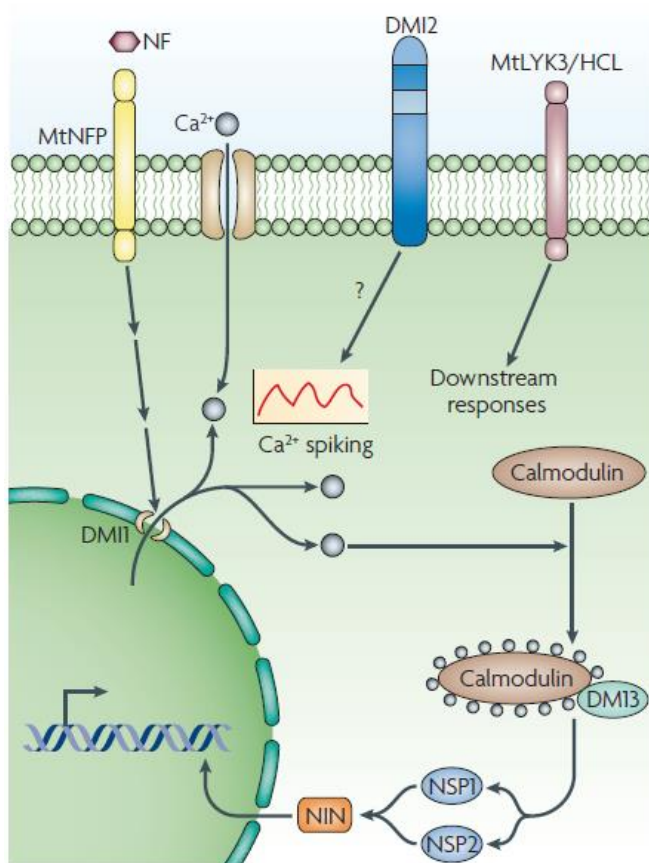
2.2. *Medicago truncatula*, mint modellnövény

Több termesztett pillangósvirágú fajnak van jól feltérképezett genomja (pl. *Glycine max*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, stb.). Azonban a nagyméretű genom, rengeteg ismétlődő szakasz, poliploidia vagy a nehézkes transzformációs rendszer mind-mind megnehezítik ezeknek a fajoknak a molekuláris vizsgálatát. Így a kutatók szükségesnek érezték, hogy találjanak olyan fajokat, melyek modell növényként funkcionálhatnak a pillangósvirágúak biológiai kutatásában. Legígéretesebb modell növénynek a *Medicago truncatula* és *Lotus japonicus* bizonyult, bár más növényeket is megkíséreltek pillangós modell növényként alkalmazni (*Meliloti alba*, borsó <*Pisum sativum*> vagy a szója <*Glycine max*>). Az egy-egy növényfajra való fókuszálás eredményessége nyilvánvaló, gondoljunk csak az *Arabidopsis*-ra, a kétszikűek modell növényére.

Több oka is van, amiért a *Medicago truncatula* alkalmas arra, hogy pillangós modell növényként használjuk. Diploid (a tetraploid lucernával ellentétben), kisméretű genomja van (8 kromoszóma, $\sim 5 \times 10^8$ bp), öntermékenyülő, de keresztezésre alkalmas, bő terméshozamú, gyorsan vált nemzedéket. Sokféle ökotípust gyűjtöttek a növény származási helyéről, a mediterrán régióból és mivel a különböző populációk más-más fenotípusos jelleggel rendelkeznek (úgy, mint növekedési erély, virágzási idő, szimbiotikus specificitás vagy akár rezisztencia) kiváló genetikai forrást jelentenek ezek a tulajdonságok a genetikai vizsgálatokhoz. Ezen kívül genetikailag közelebb áll a termesztett pillangósnövényekhez, mint a *Lotus japonicus* (R Cook 1999).

2.3. A szimbiózisban szerepet játszó jelcserék a növény és a mikroba között

A szimbiózis kialakításában résztvevő gének közül többet már sikerült azonosítani. Ezeket a géneket a folyamatban betöltött szerepük alapján hierarchikus sorrendbe lehet állítani. Az *NFP* és *NFR1/NFR5* a legfelső fokon állnak, ugyanis ezek a gének mutációjának következtében a növény semmilyen válaszareakció adására nem képes Nod faktor hatására. Az *NFP* (Nod factor perception) a LysM receptorcsalád tagja és a gyökérszőrgömbülésben, a transzkripciós változások indukálásában, majd később a baktériumok gyökérszőrön át való bejutásában játszik szerepet. A *DMI1* és *DMI2* (does not make infections – „nem képes fertőzni”) gének szükségesek a gyökérszőrök sejtjeinek citoplazmájában lévő Ca koncentráció periodikus megemelkedéséhez („Ca spiking”). A sejtekbe való Ca^{2+} beáramlás után a *DMI1* fehérje a sejtmembránjában elhelyezkedve kation csatornaként működik (3. ábra). Ha a gén funkcióját veszti, akkor a „Ca spiking” válaszareakció nem valósul meg. Ezt a fehérjét a zárwatermőkben erősen konzerválódott gén kódolja és egy ősrégi növény-specifikus „innováció” képviselője lehet, mely a mikorrhiza kapcsolat kialakulásához járult hozzá (Ané et al 2004). A *Medicago truncatula dmi1* és *dmi2* mutánsokban gyenge NF válaszareakció figyelhető meg, ami azt jelenti, hogy ezekben a mutánsokban a NF gyökérszőrgömbülést indukál, de nem vált ki „Ca spiking”-ot vagy szimbiotikus gének indukcióját. A *dmi3* mutánsok hasonló fenotípusúak a *dmi1* és *dmi2*-höz, azonban a NF ezeknél a növényeknél indukálja a „Ca spiking”-ot (Mitra et al 2004). A *DMI3* a Ca^{2+} -kötő kalmodulin függő kinázt (CCaMK) kódol, ami szükséges a sejtosztódás megindulásához a gyökér kéregsejtjeiben és a szimbiózis kialakulásához szükséges transzkripciós változások indukálásához. A CCaMK-nak azonban nincs szerepe a gyökérszőrgömbülésben és a baktérium behatolásában, melyből arra lehet következtetni, hogy ezekhez más közvetítő molekulákra van szükség. A *DMI2* egy leucin-gazdag receptor kinázt kódol, mely a baktériumokat végérvényesen körbeölelő, begömbült gyökérszőr kialakulását segíti elő (Endre és mtsai. 2002). A *dmi1*, *dmi2* és *dmi3* mutánsokban a mikorrhiza szimbiózis kialakulása is hibát szenved, jelezve, hogy ezek a gének szerepet játszanak mind a nitrogénkötő, mind a mikorrhiza szimbiózisban (Ané et al 2004). Két transzkripciós szabályozó elem, NSP1 és NSP2 (nodulin signalling pathway) is szükséges a Nod faktor kiváltotta transzkripciós változásokhoz (Smit és mtsai. 2005, Kalo és mtsai. 2005).



3. ábra: A NF szignál útvonal kezdeti lépéseinek génjei és fehérjéi , valamint az általuk kiváltott fontosabb molekuláris válaszok (Jones et al 2007).

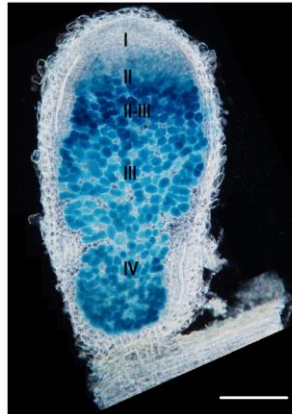
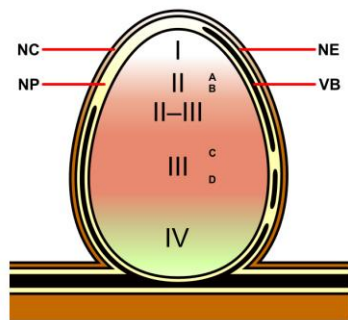
2.4. A szimbiotikus gümő

A baktériumok a gümősejtbe endocitózissal kerülnek be. Az infekciós fonal sejtfal nélküli végéről tehát baktériumokkal teli vezikulumok fűződnek le, melyek körbeveszik a baktériumokat. A rhizobiumokat tartalmazó növényi sejtmembránnal határolt sejt szervecskét szimbioszómáknak hívjuk. A szimbioszómában a baktériumok fiziológiai és morfológiai változásokon mennek keresztül és nitrogénkötő bakteroidokká differenciálódnak. Sok növényi

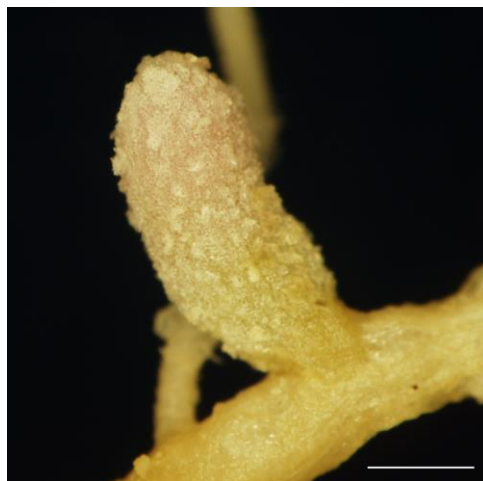
és bakteriális gén felelős azért, hogy a bakteroidok átalakulása sikeresen megtörténhessen, és hogy túléljenek a megváltozott körülmények között a növényi sejten belül (Jones et al 2007). Ezeknek a gének felderítésére különböző szimbiotikus mutáns pillangósvirágú növény és rhizobium baktérium áll rendelkezésre.

Kétféle gümőtípust ismerünk. Az indeterminált gümőknek (4. és 5. ábra) egy folyamatosan osztódó merisztémája van, amely folyamatosan hozza létre az új sejteket. Ez a gümőtípus a mérsékelt égövi pillangósvirágú növényekre jellemző, pl. *Medicago truncatula* és borsó (*Pisum sativum*). A keletkezett sejtek az indeterminált gümőkben egy fejlődési grádiens képeznek, és a sejtek fejlődési állapotuktól függően különböző zónákban helyezkednek el (4. ábra):

1. I-es zóna: A gümő csúcsán aktív merisztéma van, itt képződnek folyamatosan a gümő sejtjei, mely később differenciálódik az ezt követő zónák szövetévé.
2. II-es zóna: A merisztéma alatt található az infekciós zóna, melyet rhizobium baktériumokkal teli infekciós fonalak hálózata be, és az ebben a régióban található sejtekbe jutnak be a rhizobiumok. A sejtek mérete ebben a zónában már nagyobb. A növényi sejtosztódás már megállt, de a sejtek növekednek.
3. A II-es és III-as zóna között helyezkedik el a pár sejtrétegből álló átmeneti zóna. Az itt található sejtekbe a már bejutott baktériumok növekednek és szimbiotikus, nitrogénkötő bakteroidokká differenciálódnak.
4. III-as zóna: A nitrogénkötő zóna baktériummal teli sejtjei mind tartalmaznak egy nagy, központi vakuólumot és citoplazmájuk tele van aktív nitrogénkötő bakteroidokkal. A növény ezeket a sejteket leghemoglobinnal látja el, melytől a gümők halvány rózsaszín elszíneződést kapnak (5. ábra).
5. IV-es zóna: Az előregedő zónában a növényi sejtek és a bennük lévő bakteroidok száma csökken, itt zajlik a lebomlásuk. Rózsaszínes helyett halványzöld elszíneződés figyelhető meg a széteső leghemoglobin következtében.

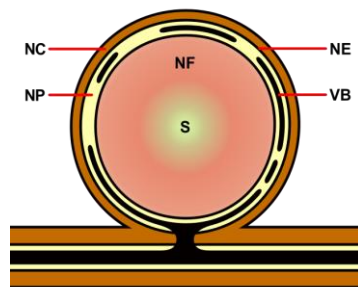


4. ábra: Az indeterminált gümő vázlata ([http5](http://5)) és *Medicago truncatula* *LacZ* riportergént hordozó baktériummal fertőzött gümő metszete X-gal festést követően. NC: gümő kéregállomány, NE: gümő endodermisz, NP: gümő parenhima, VB: szállítónyaláb, I: merisztéma, II: infekciós zóna (A: inváziós zóna, B: pre-fixációs zóna), II-III átmenet az infekciós és a nitrogénkötő zóna között, III: nitrogénkötő zóna (C: hatékony zóna, D: nem hatékony zóna) IV: előregedő zóna. Lépték: 0,5 mm. (Gödöllő, 2013.)



5 .ábra: *M. truncatula* fejlett indeterminált gümője rózsaszín színeződést mutat (A17). Lépték: 1cm. (Gödöllő, 2013.)

A determinált gümő (6. ábra) csak fejlődése korai stádiumában tartalmaz osztódó sejteket, az osztódás azonban egy idő után leáll és elveszíti központi merisztémáját. Ettől kezdve a gümő a sejtek megnagyobbodásával növekszik. Ez a gümő típus a trópusi vagy meleg égövi pillangósvirágú növényekre jellemző (pl. szója - *Glycine max* és *Lotus japonicus*).



6. ábra: A determinált gümő szerkezeti vázlata. NC: gümő kéregállomány, NE: gümő endodermisz, NP: gümő parenhima, VB: szállítóyaláb NF: nitrogénkötő zóna, S: öregedési zóna (<http6>).

2.5. A szimbiotikus nitrogénkötés folyamatában szerepet játszó növényi gének vizsgálata genetikai eszközökkel

Egy biológiai folyamat tanulmányozásában nagy segítséget nyújtanak a folyamatban hibás egyedek (mutánsok). A mutánsok fenotípusából következtetni tudunk a hibás gén szerepére, és lehetőséget adnak a gének azonosítására is (forward genetika). Ennek a megközelítésnek az alkalmazása során egy fenotípusból kiindulva azonosítjuk a folyamatban résztvevő gént. A vizsgálatokhoz természetes eredetű mutáns egyedeket, vagy különböző mutagénekkel előállított mutánsokat használhatunk és különböző módszerekkel azonosíthatjuk az adott mutációt okozó gént.

Mutáns növények előállítása során leggyakrabban a következő módszereket alkalmazzák:

- T-DNS inszerció: az Agrobaktérium eredtű T-DNS inszert a gén szekvenciába ugrik be, így a gén funkcióját veszti.

- EMS (etil-metánszulfonát) kezelés: kémiai mutagén, melynek hatására a C/G bázispárok A/T bázispárra cserélődhetnek. Ezt a mutagenizálást alkalmazzák a reverz genetika egyik eszköztárának, a TILLING (Target Induced Local Lesion IN Genomes) populációk előállítására is.
- γ sugárzás: deléciót okoz a DNS-ben.
- FNB (Fast Neutron Bombardment; gyors neutron besugárzás): szintén deléciót okoz a DNS-ben a legtöbb esetben.

2.5.1. FNB (Fast Neutron Bombardment)

A gyors neutron besugárzást több növényfaj esetében sikeresen alkalmazták növényi mutánsok előállítására (Rogers és mtsai. 2009, Bolon és mtsai. 2011, Belfield és mtsai. 2012, Domonkos és mtsai. 2013, stb.). A növény magjainak megfelelő dózisú gyors neutronnal történő besugárzása a genomi DNS átrendeződéséhez, a legtöbb esetben fragmentek elvesztéséhez vezet. A kezelés általában azt is eredményezi, hogy a magok kissé veszítenek életképességükből. A *Medicago truncatula* funkcionális genomikai vizsgálataira több FNB mutáns gyűjtemény is rendelkezésre áll (Rogers és mtsai. 2009, Domonkos és mtsai. 2013, <http://www.medicicago.org/>)

2.5.2 Genetikai térképezés

A magasabb rendű élőlények sok ezer génje lineárisan helyezkedik el a kromoszómákon, melynek száma fajra/fajtára nézve specifikus. A gének az utódokba kapcsoltsági csoportokba rendeződve öröklődnek. Egy kapcsoltsági csoport gyakorlatilag egy kromoszómát jelent. Genetikai térképezésnek azt nevezzük, mikor a kapcsoltsági csoportokon belül meghatározzuk a gének és a markerek sorrendjét. Ezek nem tartalmazzák általában az összes lehetséges gént, de elméletileg ez is megvalósítható.

Genetikai térképezésre két egyed keresztezéséből származó térképező populáció használható, melynek egyedeit használjuk a markerek öröklésmenetének vizsgálatához. Kezdetben genetikai térképezéshez morfológiai vagy biokémiai markereket használtak, de a különböző molekuláris markerek kifejlesztésével (RFLP, RAPD, SSR) a genetikai térképek készítése nagy fordulatot vett. A DNS-alapú markerek előnye, hogy a markerek száma nagyon sok, segítségükkel részletes genetikai térképek készíthetők. Egy térképező populáció szinte bármennyi marker térképezéséhez használható. Olyan kromoszóma régiókat is térképezhetünk, mely nem

tartalmaz géneket (Kaló 2000). Genetikai marker a DNS bármely, öröklődő különbséget (polimorfizmust) mutató szakasza lehet, teljesen függetlenül a funkciójától. Az egyik legkedveltebb marker az SSR (Simple Sequence Repeat), melynek kimutathatósága a DNS mikroszatellit régióinak hosszpolimorfizmusán alapszik. A változékonyságot az adja, hogy a di-, tri- vagy tetranukelotid ismétlődések az egyes családokban, fajokban, vagy akár fajtákban különböző számban vannak jelen. A mikroszatelliteket határoló régiók azonban konzervatívak lehetnek, akár növénycsaládon belül is megegyeznek, így ezekre a szakaszokra tervezett primerekkel nagyon specifikus PCR terméket kapunk. Az SSR markerek általában kodomináns kiértékelésűek, és mivel specifikusak, PCR amplifikációjuk csak egy (homozigóta esetén), vagy két (heterozigóta esetén) PCR terméket eredményez.

A genetikai térképezés lehetőséget nyújt a térképezésen alapuló génizoláláshoz (Kaló 2000), amikor egy folyamatban hibás növény mutáns fenotípusát okozó teljesen ismeretlen gént végül azonosítani tudjuk genetikai térképezés alkalmazásával. A folyamat során először meghatározzuk a mutáns lókuszt térképhehelyzetét, majd a közeli kapcsolt molekuláris markerektől kiindulva kromoszómaséta során azonosítjuk a keresett gént. A genetikai térképezés során a térképező populáció leginformatívabb egyedei a rekombinánsok, vagyis amelyek egy markerpárra nézve nem a szülői allélkonfigurációt hordozzák. Ezeknél az egyedeknél az ivarsejtek létrejöttékor a meiózis során átkeresztződés (crossing over) történt a két különböző genotípusú homológ kromoszómapár között.

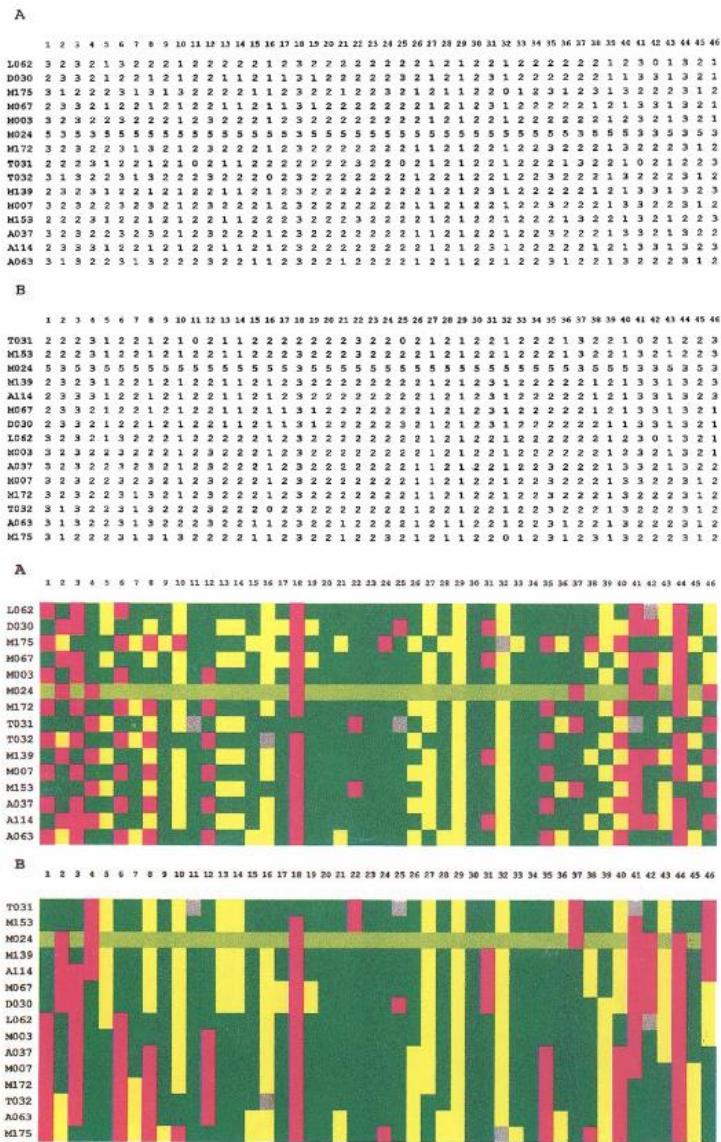
A két gén között lejátszódó rekombinációk gyakorisága egyenesen arányos a közük lévő távolsággal (Kaló 2000), vagyis minél távolabb helyezkednek el egymástól a kromoszómán, annál nagyobb az esély arra, hogy közöttük „crossing over” következzen be. A markerek közti távolságot az úgynevezett térképtávolsággal fejezzük ki, melynek mértékegysége a centimorgan (cM). Egy centimorgan 1%-os rekombinációs gyakoriságnak felel meg. Azonban a többszörös „crossing over” lehetősége miatt a térképtávolságot ún. térképfüggvénnyel számoljuk ki, mely figyelembe veszi az esetleges többszörös „crossing over” torzító hatását (Kaló 2000).

2.5.2.1. Színtérképezés

A genetikai térképezés egy nagyon hatékony módszere a színtérképezés (Kiss et al 1998). A színtérkép egy olyan mátrix, melyben minden sor egy markernek felel meg és minden oszlop egy egyed genotípusát mutatja a szegregáló populációban a különböző markerekre nézve. A

színtérkép megjelenítéséhez Excel táblázatot használunk, ahol a genotípusokat különböző színekkel kódoljuk. A színtérkép alkalmas meglévő növényi anyag genotípusainak vizsgálatára, genetikai térkép szerkesztésére, valamint új markerek elhelyezésére meglévő kapcsoltsági térképbe. A Kiss és munkatársai által kidolgozott színtérképben (1998) számok mellett különböző színek képviselnek egy bizonyos genotípust. Például az anyai homozigótát az 1-es, apai homozigótát 3-mas és a heterozigótát a 2-es szám jelöli. Ezen kívül a 4 apai domináns, az 5 anyai domináns, a 0 hiányzó adatot jelent. Ezeket a genotípusadatokat szám helyett színnel helyettesítjük, vagyis 0, 1, 2, 3, 4 és 5 helyett szürke, sárga, zöld, lila, metálkék és világoszöld színeket használunk (7. ábra).

Új lókuszok behelyezése a színtérképbe viszonylag könnyen kivitelezhető, hisz az emberi szem könnyen észreveszi, hova illik be legjobban az új színsor, vagyis hol hasonlít legjobban a genotípus mintázat a meglévő színsémához. Ez a hely ott van, ahol a legkevesebb rekombinációs eseményt kell feltételeznünk (Kiss et al 1998, Kaló 2000). A 7. ábrán is jól látszik, hogy a színtérképen mennyivel jobban láthatóak a különböző genotípusok és a rekombinációs események, mint azon a térképen, ahol a genotípusokat csak számokkal jelölték.



7. ábra: A hagyományos szám alapú genotípus a színtérképpel összehasonlítva. **A:** A markerek nem összerendezett sorrendje számmal, majd színnel kódolt genotípussal. **B:** A markerek sorrendbe állítva a genotípus alapján számmal, majd színnel kódolt genotípussal. (Kiss et al 1998)

3. CÉLKITÚZÉS

A gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növénygenomikai és Növény-mikroba Interakció Csoportja évek óta kutatja a *Medicago truncatula*, mint pillangósvirágú modellnövény és rhizobium baktérium között létrejövő szimbiózisban résztvevő növényi géneket.

Diplomamunkám célja két, a szimbiotikus nitrogénkötésben hibát szenvedett mutáns növény vizsgálata, és a génazonosításhoz szükséges kezdeti lépések megtétele volt. Ehhez a következő lépéseket tűztük ki célul:

1. A növények fenotípusos jellemzése.
2. Szegregáló populáció felállítása után a genetikai térképezés megkezdése.
 - 2.1. Ha a mutáció olyan kapcsoltsági csoportra térképeződik, melyen korábban már azonosított szimbiotikus nitrogénkötésben résztvevő gének helyezkednek el, akkor meg kell vizsgálnunk a régi és az új mutánsok allélikus viszonyait. Ha korábban már felfedezett génben mutáns a növény, akkor megkezdjük a gén szekvenálását az új mutánsban.
 - 2.2. Ha azt találjuk, hogy a mutáció nem érinti a korábban már azonosított géneket, folytatjuk a genetikai térképezést.
3. A mutáns növény további morfológiai vizsgálatai (gümőmetszetek készítése és vizsgálata).
4. A mutáns gén térképpozíciójának pontosítása és szintérkép készítése.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényi anyagok

4.1.1. Növényi anyag eredete és nevelése

Kísérleteinkhez a *Medicago truncatula* A17 és A20 genotípusú, valamint A17 genomi háttérben gyors neutron besugárzással mutagenizált növényeket használtuk. Az NF-FN9199 (Noble Foundation-Fast Neutron) és NF-FN9285 jelű szimbiotikus mutánsok a Samuel Roberts Noble Foundation kutatóintézet (Ardmore, OK, USA) gyűjteményéből származtak ([http8](http://8)).

Ezen mutánsok vizsgálata során más, szimbiotikus nitrogénkötésben hibát szenvedett növényekkel is dolgoztunk, mikor a mutánsok allélikus viszonyait hasonlítottuk össze, vagy amikor a növények fenotípusát vetettük össze. Ezek a mutánsok a következők voltak: 13U (Domonkos et al, 2013.), *dnf2* (Starker et al. 2006), *nsp2* (Kalo et al 2005).

A növények csíráztatása és nevelése

A *M. truncatula* magokat tömény kénsavval kezeltük 3 percen át, majd steril desztillált vízben történő mosás után három órán át duzzasztottuk a vizet óránként cserélve. A magokat 1%-os vizes agaros lemezre tettük és 3-4 napig 4°C-on, sötétben vernalizáltuk, mely elősegíti a későbbi csírázást és fejlődést. Ezután szobahőmérsékleten, még mindig sötétben a magok felégy nap alatt csíráztak. A kicsírázott magokat 1/3 arányban steril homokot, 2/3 arányban steril zeolitot (Geoproduct Kft., Mád) tartalmazó növénynevelő tálcákra helyeztük. A magoncok ezután növénynevelő kamrában fejlődtek tovább 16/8 órás fényperióduson 24°C-on, ill. 20°C-on.

4.1.2. A növények fertőzése *rhizobium* baktériummal

A növényeket kiültetés után azonnal *Sinorhizobium medicae* WSM419 *LacZ* riportergént tartalmazó törzsével fertőztük le. A baktérium telepeket petricsészében, antibiotikum tartalmú (15 µg/ml tetraciklint és 20 µg/ml kloramfenikol) TA táptalajon (Sambrook és Russell, 2001) szélesztettük, ahonnan különálló telepekről folyékony, antibiotikum tartalmú 2-2 ml TA tápoldatot oltottunk be kémcsövekben. A beoltott tápoldatot 48 órán át 28°C-on rázattuk. A

felnevesztett baktériumszuszpenziót 2 ml-es eppendorf csőbe áttöltöttük, majd 10 percig, 3000 rpm-en ülepitettük. A felülúszó eltávolítása után a leülepedett baktériumokat 50-50 ml folyékony Gibson tápközegben (Gibson és Nutman 1960) újra szuszpendáltuk ($OD_{600} = 0,05 - 0,1$). A növények fetőzése során az ültető tálcába növényenként 1 ml rhizobium baktérium tartalmú Gibson tápfolyadékot pipettáztunk.

4.1.3 Növények keresztezése

Az F1 allétesztek elvégzéséhez különböző *M. truncatula* mutánsok keresztezését végeztük el a Medicago Handbook instrukciói alapján (Chabaud és mtsai. 2007), de röviden itt is ismertetem. A *M. truncatula* egy önbeporzó növény, ezért a keresztezést még azelőtt el kell végeznünk, mielőtt az öntermékenyítés bekövetkezne. Az öntermékenyülés még azelőtt megtörténik, hogy a virág kinyílna, ezért az anyai vonalakon olyan virágokat kerestünk, melyek még zárt, viszonylag korai állapotban voltak. A vitorlaleveleket óvatosan leválasztottuk, majd felnyitottuk a többi szíromlevelet, hogy hozzáférjünk a bibéhez és a porzókhoz. Mikroszkóp alatt megvizsgáltuk, hogy a portokok felülete teljesen sima-e vagy találhatók már rajta pollenszemek. Ha igen, akkor nem dolgoztunk tovább vele, mert az öntermékenyítés már megtörténhetett. Ha nem láttunk pollenszemeket, akkor a portokokat eltávolítottuk, „kasztráltuk” a virágot. Egy, a másik szülővonalról származó érett virágzatról polleneket juttatunk a bibére, majd egy párás környezetet biztosító, vattával lezárt műanyag csőbe helyeztük a virágot. Ha bekövetkezett a megtermékenyülés, akkor pár múlva megindult termés fejlődése.

4.2. Mikroszkópos vizsgálatokhoz használt anyagok és módszerek

A gyökerekről, gyökérrészletekről és egész gümőkről készült képeket a homokos-zeolitos tápközegből frissen kiemelt növényekről készítettük Olympus SZX12 típusú sztereo mikroszkóp segítségével.

4.2.1. Gümőmetszet készítése

Négy héttel a rhizobiummal történő fertőzést követően a növényekről gümőket gyűjtöttünk, melyeket azonnal 1xPBS pufferbe (1,37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM

KH₂PO₄) tettünk. Az oldat pH-ját HCl-dal állítottuk be 7,4-re. A gümőket 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, melyet a következő módon készítettünk el: 100 ml 1xPBS puffert NaOH-dal pH 11-re állítottuk be, melyet aztán 60°C-ra melegítettünk. A felhevített puffert előzőekben csavaros kupakos üvegbe kimért 4 g paraformaldehidre (Sigma-Aldrich) mértük, majd az oldódást követően haladéktalanul lehűtöttük és kénsavval (H₂SO₄) az oldat pH-ját 7-re állítjuk. Felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A mintákat jéghideg paraformaldehid oldatba helyeztük, majd jégre téve 30 percig ráztattuk. Ezt követően a fixáló oldatot leöntve 1x PBS pufferben mostuk a gümőket háromszor 15 percig, majd felhasználásig 4°C-on tároltuk.

A fixált gümőket 5%-os agaróz gélbe ágyaztuk úgy, hogy a gümők lehetőleg fekvő pozícióban legyenek és ágyazás előtt alaposan leitatuk róluk a folyadékot. A gélbe ágyazott mintákról Leica VT 1200S típusú vibratom segítségével 70 µm vastagságú hosszmetseteket készítettünk.

4.2.2 Gümőmetsetek festése

4.2.2.1. X-Gal festés

A baktériumok nyomon követésére és azonosítására a *LacZ* markergént használtuk, és a markergént hordozó *S. medicae* törzsszel végeztük a növények fertőzését a gümő morfológiai vizsgálatokhoz. A *LacZ* gén a β-galaktozidáz enzimet kódolja, ami az X-Gal szubsztrátot (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) egy kék színű festékanyaggá alakítja és így láthatóvá teszi a gént hordozó organizmust.

X-Gal festéshez a következő tartalmú festő oldatot mértük össze: 100 µl 100 mM kálium-ferricianid, 100 µl 100 mM kálium-ferrocianid, 100 µl 2%-os X-Gal, 4 µl 1M MgCl₂, melyet 1698 µl 1 x PBS pufferrel egészítünk ki 2 ml-re. A festőoldatban a gümőmetseteket 30 percig inkubáltuk 37°C-on. Kétszeri, 10 percen át 1xPBS pufferben történő mosás után a gümőmetseteket egy csepp MQ vízben a tárgylemezre helyezve és fedőlappal lefedve Olympus BX41 típusú fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket Olympus CaMedia E-10 típusú fényképezőgéppel készítettük.

4.2.2.2. Toluidinkék festés

A festék kékre színezi a nukleinsavakat, így láthatóvá válnak a baktériumok. Az elsődleges sejtfalvastagodást rózsaszínesre, a másodlagos sejtfalvastagodást pedig zöldesre színezi. A metszetek festését 2%-os toluidinkék oldattal körülbelül 1 percig végeztük, ezután a metszeteket MQ vízben leöblítettük és így helyeztük tárgylemezre.

4.3. Molekuláris genetikai anyagok és módszerek

4.3.1. DNS kivonás

A növényi DNS tisztításhoz a Zenon Bio Kft. (Szeged) által gyártott Zenogene növényi DNS tisztító kit-et használtuk a gyártó leírása szerint. A növény zsenge, frissen szedett levelét használtuk fel. A DNS mintát 50 µl eluáló oldatban oldottuk le.

A koncentráció ellenőrzése

A koncentráció minden minta esetében más, és a nagyszámú mintára való tekintettel a koncentrációkat nem mértük le, de minden minta esetében ellenőriztük a következő módon: A kapott 50 µl DNS mintából 1 µl mintát 1%-os agaróz gélen elválasztottuk és a DNS-t etidium-bromiddal festettük meg, majd UV fény alatt tettük láthatóvá és vizsgáltuk meg. Az egyes minták sávjainak erőssége alapján a DNS kivonat 10x-es vagy 5x-ös hígítását alkalmaztuk a PCR reakció során.

4.3.2. Molekuláris genetikai markerek és felhasznált primerek

Mivel a *Medicago truncatula* a pillangóvirágú növények modellnövénye, genomja jól feltérképezett, sok DNS alapú molekuláris marker áll rendelkezésünkre a genetikai térképezéshez (Choi et al 2004, Mun et al 2006, www.medicago.org), melyeket munkánk során felhasználtunk.

[M1] megjegyzést írt: Ide tedd be légi szíves a használt NSP2 primerek szekvenciáját.

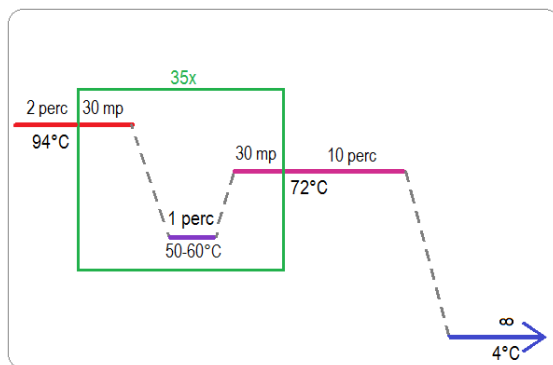
4.3.3. Polimeráz láncreakció

A reakció összetevőit 12 µl-ben a következőképp mértük össze:

- 1µl növényi DNS
- 1µl forward és 1µl reverz primer (koncentráció: 10 pmol/ml)
- 6 µl 1,5 mM MgCl₂ koncentrációjú puffer (20 ml puffer tartalmazza: 500µl 4M KCl, 400µl 1M Tris HCl, 60µl 1M MgCl₂, 84µl dTTP, 84µl dATP, 84µl dGTP, 84µl dCTP 18,805 ml steril MQ vízben, tárolás -20°C-on)
- 2,85 µl desztillált (MQ) víz

A reakciók MJ Research PTC-200 vagy BIORAD DNA Engine típusú PCR készülékek segítségével végeztük el. A 8. ábra a reakció hőmérsékleti változásait, azok időtartamát és a ciklusok számát szemlélteti. Két perces, 94°C-os kezdeti denaturációs hőmérséklet után ismétlődő ciklusok következtek, melyek általában 35 alkalommal ismétlődtek. A fél perces 94°C-os denaturáció után az 1 perces (rövidebb fragment esetén fél perc is lehet) annealing (primerhibridizációs) hőmérséklet következik. Ez a hőmérséklet az adott primerre van optimalizálva, de az esetek legnagyobb részében 55°C-os. Ezután a 72°C-os hőmérsékleten a Taq polimeráz (Zenon Bio Kft.) dolgozni kezd és megkezdődik a lánchosszabbítás. Az utolsó ciklus után 10 perces végső lánchosszabbítás következik, majd a gép a mintákat 4°C-ra hűti, s felhasználásig 4°C-on tároljuk.

Az amplifikációs termékeket annak méretétől és tulajdonságaitól függően 1-3%-os Lonza SeaKem® LE Agarose vagy 3,5%-os NuSieve™ 3:1 Agarose gélben futtattuk meg és választottuk el 1xTAE pufferben. A DNS fragmenteket Etidium-bromiddal festettük meg és UV megvilágítással tettük láthatóvá Syngene géldokumentációs rendszerrel.



8. ábra: A PCR reakció sematikus ábrája, mely a hőmérsékleteket, azok hosszát és a ciklusos ismétlődést szemléltetik.

4.3.3.1 Kolónia PCR

A transzformáns *Escherichia coli* sejtekben az inszert jelenlétét kolónia PCR-rel mutattuk ki. Egy-egy kiválasztott telepről steril fogvájó vagy pipettahegy segítségével a PCR (a fentebb leírt) reakcióelegybe mostuk a baktériumokat, majd elvégeztük a reakciót a PCR készülékek segítségével. A PCR termékeket ezután 1-2%-os agaróz gélen választottuk el. A kapott fragmentek méretéből következtethettünk arra, hogy az inszertet valóban tartalmazza-e az adott baktérium kolónia.

4.3.3.2. Primerek tesztelése

Ha a primernél nem ismertük az optimális primerhibridizációs hőmérsékletet, grádiens PCR-t végeztünk. Ehhez olyan PCR gépet alkalmaztunk, mely képes egy időben különböző annealing hőmérsékleteket biztosítani, miközben a PCR reakció többi eleme (úgy, mint a reakció egyéb hőmérsékletei, PCR reakcióelegy összetétele, a DNS minta, tesztelendő primerek) változatlan. A következő primerhibridizációs hőmérsékleteken teszteltünk: 49,9°C, 52°C, 54,6°C, 57,6°C, 60,2°C, 62,2°C. A PCR termékeket gélelektroforézissel választottuk szét, mely alapján megállapítottuk a leghatékonyabb primerhibridizációs hőmérsékletet.

4.3.4. PCR termékek klónozása és szekvenálása

Az NSP2 gén szekvenciáját meghatároztuk az NF-FN9199 mutánsban. Ehhez két, egymást átfedő NSP2 gén részletet amplifikáltunk PCR reakcióban. A két primer pár szekvenciája a következő:

- NSP2_F4: aggaaccggccggaggtcaatc
- NSP2_R4: acccttgcatctttgctcccatagtt
- NSP2_F5: ttccgcttaatagaatatcaacgatcc
- NSP2_R5: gaggggaagcggcaaaggaggtta

A fragmenteket 1%-os gélből tisztítottuk Promega PCR tisztító kittel (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System). A szekvenciákat pGEM®-T Easy Vector-okba ligáltuk a gyártó utasításai alapján, majd a ligálási reakcióból 5 µl-nyi mennyiséget *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltunk. A baktérium szuszpenziót ampicillin (100 µg/ml) és kék-fehér szelekciót lehetővé tevő IPTG (0,1Mol) és 2%-os X-Gal tartalmú LB (Sambrook & Russel 2001) táptalajra szélesztettük. Az inszertet tartalmazó fehér színű klónokból kolónia PCR-rel bizonyosodtunk meg az inszert jelenlétéről. A kiválasztott pozitív *E.coli* baktérium kolóniákból a transzformáns plazmidokat QIAprep Spin miniprep Kit-tel végeztük a gyártó által megadott protokoll szerint. A tisztított plazmidokban lévő inszert szekvencia meghatározása a láncterminációs eljárás alapján alapuló szekvenálással (Sanger et al 1977) végeztettük el a BIOMI Kft.-vel (Gödöllő). A kapott szekvencia adatokat DNASTAR Seqman számítógépes programmal dolgoztuk fel.

4.3.5. Színtérkép színkódjai

Dolgozatomban használt kód szerint az anyai homozigótát sárga, a heterozigótát zöld, az apai homozigótát ciklámen, a nem anyai homozigóta genotípust metáلكék és a nem apai homozigótát világoszöld színnel jelöltük, s mindezt Excel táblában kezeltük.

chi négyzet számítás, 9199 és 9295 egy génes recesszív tulajdonságként öröklődnek a szimbiotikus fenotípusok (NOD- és FIX_ tulajd.)

5. EREDMÉNYEK ÉS AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. *Medicago truncatula* szimbiotikus mutánsok vizsgálata

Munkám során két *Medicago truncatula* mutánst vizsgáltam, melyek a szimbiotikus nitrogénkötés folyamatában szenvedtek hibát. A növények a S. R. Noble Foundation (Ardmore, OK, USA) gyors neutron besugárzással előállított mutáns gyűjteményéből származtak. A növényeket egy előzetes és gyors mutáns keresési sorozatban azonosították szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növényként, ahol szimbiotikus körülmények között nevelve mutatták a nitrogénhiány jellegzetes tüneteit. A mutáns fenotípus megerősítéséhez és részletesebb jellemzéséhez a növényeket kötött nitrogént nem tartalmazó tápközegben neveltük és vizsgáltuk hét héttel *Sinorhizobium medicae* fertőzést követően. Szimbiotikus körülmények között a fertőzést követő negyedik héten már látszódtak a nitrogénhiány jellegzetes tünetei a mutáns növényeken. A mutáns növények gyengébb növekedésűek voltak és kisebb, halványzöld méretű leveleket fejlesztettek a kontrol vad típusú növényekhez képest (9. és 11. ábra). A növények szárán antociános elszíneződés figyeltünk meg, ami feltehetően a tápanyaghiány okozta stressz következménye. Amennyiben a növényeket kötött nitrogént tartalmazó talajban neveltük, ezek a fenotípusos bélyegek nem voltak detektálhatók a mutáns növényeken.

A tápközegből a fertőzést követő hetedik héten kiemelt NF-FN9199 (Noble Foundation–Fast Neutron) jelű mutáns növények gyökerén nem találtunk szimbiotikus gümöket (10. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy az NF-FN9199 mutáns esetében a szimbiotikus kölcsönhatás már a korai szakaszban elakad és a növény nem képes nitrogénkötő gümő kialakítására, ún. Nod-mutáns.

[M2] megjegyzést írt: Nincs véletlenül gümőt tartalmazó vad, és nod- mutáns gyökérről fotó?



9. ábra: NF-FN9199 mutáns és A17 vad típusú növények fenotípusa 7 héttel *S. medicae* fertőzést követően. A mutáns növényeken jól láthatóak a nitrogénhiány okozta a fenotípusos tünetek. Lépték: 1 cm. (Gödöllő, 2013.)



10. ábra: A: NF-FN9199 mutáns és A17 vad típusú növény gyökere hét héttel a kiültetés és *S. medicae*-vel való lefertőzés után. Míg a vad típusú növény gyökerén láthatóak a gümők (néhány jól látható gümő piros nyíllal jelölve), a mutáns gyökerén egyáltalán nincsenek (Nod-). Lépték: 1cm. (Gödöllő, 2013)

A NF-FN9285 mutáns gyökerén képződtek szimbiotikus gümők, de azok a vad típusú gümökhöz képest kevésbé fejlett apró gümők voltak és számuk sokszorosa volt a vad típusú növényekhez képest. Az mutáns gyökéren fejlődött gümők mind fehérek voltak, jelezve, hogy ezek a gümők nem tartalmaztak leghemoglobint (11. ábra). A növény és a gyökérgümő fenotípusából arra következtettünk, hogy az NF-FN9285 mutáns nem volt képes hatékony nitrogénkötésre és a gyökerén Fix- (ineffektív) gümők keletkeztek.



11. ábra: A: A17 vad típusú gümő és B: növény illetve C: NF-FN9199 mutáns növények és D: azok gümői. Lépték: A, D: 1mm, B, C: 1cm. (Gödöllő, 2013)

5.2. A mutáns lókuszok kromoszómális helyzetének megállapítása

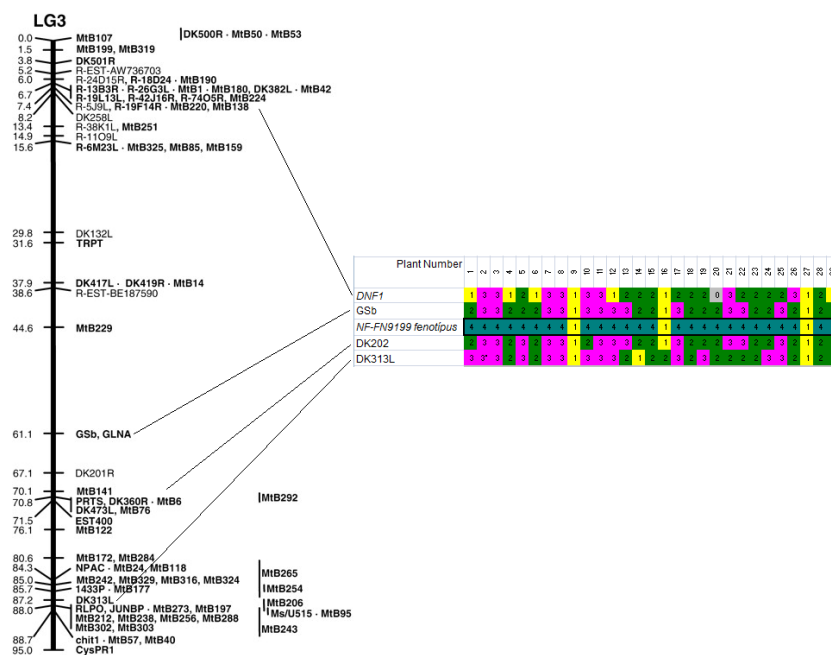
Kísérleteink következő szakaszában elvégeztük a mutáns lókuszok genetikai térképhelyének meghatározását. Ezzel egyrészt információt szerettünk volna nyerni, hogy nem egy korábban más azonosított szimbiotikus mutáns lókusszal van-e dolgunk, másrészt célunk volt, hogy előkészítsük a mutációt szenvedett gén azonosítását, melyet pozicionális klónozással terveztünk elvégezni. A genetikai térképezéshez az MBK Növénygenomikai Csoportjában már előállítottak szegregáló populációkat a két szimbiotikus mutáns keresztezésével. A két Jemalong genetikai háttérrel rendelkező mutánt egy *M. truncatula* A20 genotípusú növényvel keresztezték és az F1 hibrid növény önbeporzásával állították elő az F2 szegregáló populációkat. A genetikai térképezéshez az NF-FN9199 x A20 F2 populáció 29, míg NF-

FN9285 x A20 F2 populáció 24 egyedét használtam. Meghatároztuk az F2 egyedek szimbiotikus fenotípusát a korábban leírtak szerint kötött nitrogént nem tartalmazó tápközegben. Az NF-FN9199 F2 nemzedék 29 növényből csupán 3 növény volt Nod-, ami jelezte a torzult szegregelési arányt az F2 populációban. Az NF-FN9285 populáció 24 növényből 5 mutatott Fix- fenotípust, azonban 4 növénynek nem tudtuk megállapítani a fenotípusát, mert elpusztultak a fenotípus kiértékelhetősége előtt, vagy pedig a növények gyenge fejlettsége miatt nem volt lehetséges a fenotípus biztos megállapítása. Habár a két mutáns lókuszt szegregálási aránya eltért a várt 3:1 szegregálási aránytól, ennek ellenére az tűnt legvalószínűbbnek, hogy a mutáns fenotípusok egyénes recesszív módon öröklődtek. A vad fenotípusú növények genotípusa ezzel szemben lehetett homozigóta vad típusú vagy heterozigóta. Így a növényeket fenotípusuk alapján két genotípusos osztályba sorolhattuk: homozigóta mutáns (A17 genetikai háttérrel) és nem homozigóta mutáns.

A genetikai térképezés következő lépéseként szeretnénk volna meghatározni, hogy a mutáns lókuszt mely kapcsoltsági csoportba térképeződnek (durva térképezés). A térképezéshez kiválasztottunk a *M. truncatula* mind a nyolc kapcsoltsági csoportján 2-3, egymástól távolabb eső markert, melyekre meghatároztuk a szegregáló populáció egyedeinek genotípusait. A genotípusok genetikai analízisével vizsgáltuk a fenotípusok és a genetikai markerek kapcsoltsági viszonyait. A durva térképezés menetét mind a nyolc kapcsoltsági csoportra nézve az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáción mutatom be. Szemléltetés céljából egy, a génnel nem kapcsoltsági (12. ábra) és a génnel kapcsoltsági csoport (13. ábra) két-három markerre meghatározott szintérték látható, a többi kapcsoltsági csoport ábrája a mellékletekben található.

13. ábra: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintértképe a négyes kapcsoltsági csoporton három markerre nézve. A genetikai markerek és a fenotípus között kapcsoltság mutatható ki.

Első lépésként tehát meghatároztuk a mutáns fenotípust eredményező genetikai lókuszok térképhelyzetét. Kapcsoltságot az NF-FN9199 mutáns lókusz esetében a hármas kapcsoltsági csoporton (14. ábra), NF-FN9285 növénynél a négyes kapcsoltsági csoporton találtunk. A térképpozíciót pontosítva mindkét mutáns fenotípust olyan genetikai régióba térképeztük, amelyben már korábban azonosított szimbiotikus gének is elhelyezkednek. Annak eldöntésére, hogy az újonnan azonosított és a korábbi mutánsok allélikus kapcsolatban vannak-e F1 allélteszt kivitelezésével terveztük elvégezni.



14. ábra: Az NF-FN9199 x A20 szegregáló populáció szintértképe a hármas kapcsoltsági csoporton. A markerek és a fenotípus között kapcsoltság van.

A mutáns lókuszok és ismert szimbiotikus fenotípusok allélviszonyainak vizsgálata

A mutáns lókuszok allélviszonyainak eldöntéséhez az NF-FN9199 és NF-FN9285 mutánsokat összekeresztettük azokkal az ismert mutánsokkal, melyek hasonló kromoszómális régióba térképeződtek a korábbi irodalmi adatok alapján (Kaló et al. 2005, Bourcy et al. 2013, Domonkos et al. 2013). Ha ugyanabban a génben történt a mutáció a két szülőben, akkor a keresztezés eredményeként kapott hibrid növények is mutáns fenotípusúak lesznek. Abban az esetben, ha nem ugyanabban a génben hibásak, akkor F1 utódaik vad fenotípust mutatnak, mert a mutáns géneket a másik szülő ép allélja komplementálni fogja.

5.2.1. NF-FN9199 mutáns allélteszt eredménye

A NF-FN9199 mutáns lókusz kromoszómális helyzete alapján arra gyanakodtunk, hogy ugyanabban a génben következett be mutáció az NF-FN9199 mutáns növényben, mint az *nsp2* Nod- mutánsban (Oldroyd and Long 2003, Kaló et al. 2005). Vizsgáltuk az F1 hibridek szimbiotikus fenotípusát, ami alapján el tudjuk dönteni az allélikus viszonyokat.

Az *nsp2* x NF-FN9199 keresztezés öt esetben volt sikeres, melynek eredményeként 24 magból 20, míg az egy reciprok keresztezés esetében 10 magból 9 növényt tudtunk felnevelni. A szülői vonalak F1 utódai mind mutáns (Nod-) fenotípusúak voltak (15. ábra). Ebből arra következtethettünk, hogy a két növény ugyanabban a génben mutáns. A 16. ábrán az alléltesztben résztvevő növényeket reprezentáló 1-1 növény látható.



15. ábra: NF-FN9199, *nsp2* mutánsok, Jemalong vad típusú *Medicago truncatula* növények, valamint a két mutáns keresztezéséből származó hibridek (fehérrel bekeretezve) 6 héttel *Sinorhizobium medicae*-vel való lefertőzés után kötött nitrogént nem tartalmazó homokos-zeolitos növénynevelő tálcában. Az F1 hibridek mutáns szimbiotikus fenotípusúak, amiből arra következtetünk, hogy a mutáns szülővonalak ugyanabban a génben hibásak. (Gödöllő, 2013.)



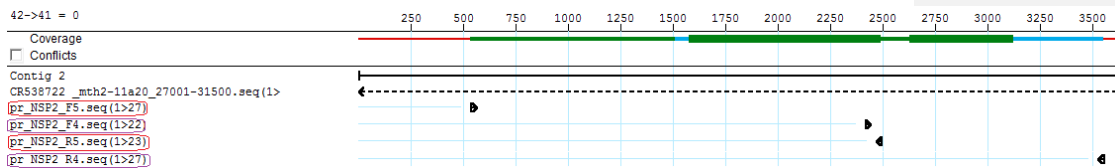
16. ábra: A: NF-FN9199 mutáns, B: *nsp2* mutáns, C: Jemalong vad típusú, D,E,F: a két mutáns három keresztezési eseményéből származó F1 hibrid. 6 héttel a csírák kiültetése és *Sinorhizobium medicae*-vel való lefertőzése után. Lépték: 1cm. (Gödöllő, 2013.)

Az eredmények arra világítottak rá, hogy a NF-FN9199 növény mutáns fenotípusát az *NSP2* gén mutációja okozza. Az eredmények tükrében megkezdtük az NF-FN9199 mutáns növényben az *NSP2* gén szekvenálását, hogy pontosan azonosíthassuk a mutációt.

5.2.2 Az *NSP2* gén szekvenciájának meghatározása az NF-FN9199 mutáns háttérben

A növényből két, egymást átfedő kontigot szekvenáltunk, mely lefedi az *NSP2* gén kódoló szekvenciáját (17. ábra). A meghatározott szekvenciát összehasonlítottuk a vad típusú *NSP2* szekvenciával, és nem találtunk különbséget az NF-FN9199-es mutáns és a Jemalong

szekvencia között. Az alléleszt egyértelműen mutatta az *nsp2* és NF-FN9199-es mutáns növények allélikus viszonyát, ezért a továbbiakban az *NSP2* gén szabályozó régióinak (promóter, 3' nem transzlálódó régió) szekvenciavizsgálatát tervezzük elvégezni, mert valószínűleg ezekben a régiókban következett be mutáció.



17. ábra: A szekvenciameghatározás során használt primerek a lilával jelölt NSP2_F4/R4 és a kékkel jelölt NSP2_F5/R5, melyek egymást átfedő fragmentumokat fognak át. A felső számsor a bázispárok számát jelenti, a nyilacskák pedig a primerek kapcsolódási helyét és irányultságát a szekvencián. Az egymással szemben álló primerek segítségével a közük lévő szakaszt amplifikáltuk fel a PCR során és ezeknek a fragmentumoknak a szekvenciáját határoztuk meg.

5.2.3. NF-FN9285 mutáns alléleszt eredménye

Az NF-FN9285 mutáns lókuszhhoz hasonlóan a négyes kapcsoltsági csoport középső és alsó régiójába térképeződnek a korábban már azonosított *DNF2* (do not fix nitrogen2; Bourcy et al. 2013) és a 13U (Domonkos et al 2013) mutánsok génje is. Annak eldöntésére, hogy a NF-FN9285 mutáns valamelyik másik mutánsnak lehet-e allélja, itt is elvégeztük az F1 allélesztet. Korábban az MBK Növénygenomikai Csoportjában végzett kísérletekből tudtuk, hogy a 13U és a *dnf2* mutánsok egymásnak nem alléljai.

A keresztezéseket oda-vissza elvégeztük, végeredményképp 72 db magot kaptunk, melyekből összesen 67 növényt neveltünk fel. Ezek megoszlása a következő volt:

- 13U x NF-FN9285 - 27db mag
 - NF-FN9285 x 13U - 5 db mag
 - NF-FN9285 x *dnf2* - 5 db mag
 - *dnf2* x NF-FN9285 - 25 db mag
- } 26 növény
 } 41 növény

[M3] megjegyzést írt: Mint kiderült nem volt mind hibrid!

A képen (18. ábra) az alléleszt 6 hetes növényei láthatóak a növénynevelő tálcán szimbiotikus körülmények között nevelve. (*Sinorhizobium medicae* WSM 419 LacZ törzsével lefertőzve). Bal oldalt a kontroll növények, fehérrel bekeretezve a mutáns szülőktől származó F1 hibridek. A kontroll növényeknél jól megkülönböztethetőek a mutánsok, melyek nitrogén hiányában kisebbek és halványabb zöldek a vad típusúnál. A hibridek 18 termésből származó magokból nevelt növények, vagyis 18 keresztezési kísérlet eredményei. Döntő többségben az utódok vad fenotípust mutatnak, mely arra enged következtetni, hogy a keresztezett mutáns szülővonalaknál más-más génben van a mutáció. Három esetben azonban, melyet narancssárgával jelöltünk, az utódok mutáns fenotípust mutattak. Ennek oka feltehetően az, hogy az anyanövény önbeporzással termékenyült meg, vagyis a magok nem keresztezés eredményei voltak. Ez nem cáfolja az előbbi következtetést, miszerint más génben mutánsak a szülővonalak, hisz akkor a keresztezés egyáltalán nem eredményezett volna vad fenotípusú F1 utódokat.



18. ábra: NF-FN9285, *dnf2* és 13U mutánsok, A17 vad típusú növény, valamint az NF-FN 9285 a másik két mutánssal történő keresztezéséből származó F1 növények (fehérrel bekeretezve) 6 héttel *S. medicae*-vel való lefertőzés után kötött nitrogéntől mentes, homokos-zeolitos növénynevelő tálcában. Az F1 hibridek vad

fenotípusúak, amiből arra következtetünk, hogy a mutáns szülővonalak különböző génekben hibásak. (Gödöllő, 2013.)

Az eredmények tükrében, miszerint az NF-FN9285 növény mutáns génje nem allélja sem a *dnf2*-nek, sem a 13U mutáns génjének, a genetikai térképezést folytattuk annak érdekében, hogy a mutáció térképpozícióját pontosítsuk. Eközben további morfológiai vizsgálatoknak is alávetettük az NF-FN9285 növényt, melynek során a három, alléltesztben résztvevő mutánt is összehasonlítottuk egymással és a vad típusú növényvel.

5.3. Az NF-FN9285 mutáns növény további morfológiai vizsgálatata és összehasonlítása a *dnf2* és 13U mutánsokkal

A *dnf2*, 13U és NF-FN9285 mutánsok, valamint a vad típusú növények morfológiai vizsgálata azt mutatta, hogy a négy növény közül az NF-FN9285 rendelkezik a leggyengébb növekedési eréllyel (19. ábra).

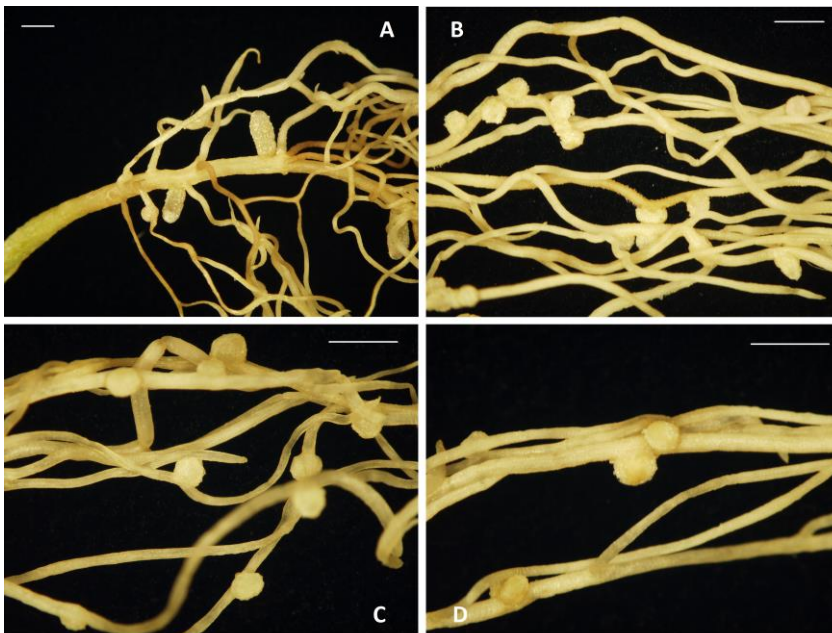


19. ábra: A: A17 vad típusú, B: NF-FN9285 mutáns, C:13U mutáns, D: *dnf2* mutáns növények kötött nitrogén nem tartalmazó, homokos-zeolit tápközegben. A fotó 7

héttel a csírák kiültetése és *S. medicae*-vel való lefertőzése után készültek. Lépték: 1 cm.
(Gödöllő, 2013.)

5.3.1. Az NF-FN9285 mutáns növény gümőmorfológiája

A gyökerek és gümők mikroszkópos vizsgálata során azt figyeltük meg, hogy mind a három mutáns Fix-, vagyis a gümők kialakulnak, de azokban feltehetően nem folyik hatékony nitrogénkötés. Megfigyeltük még, hogy egyik mutáns növény sem rendelkezik a vad típusúra jellemző hosszúknak, halvány rózsaszínű gümőkkel, hanem nagyobb mennyiségű, kerekdedebb formájú, kisebb méretű gümőt fejlesztettek (20. ábra).



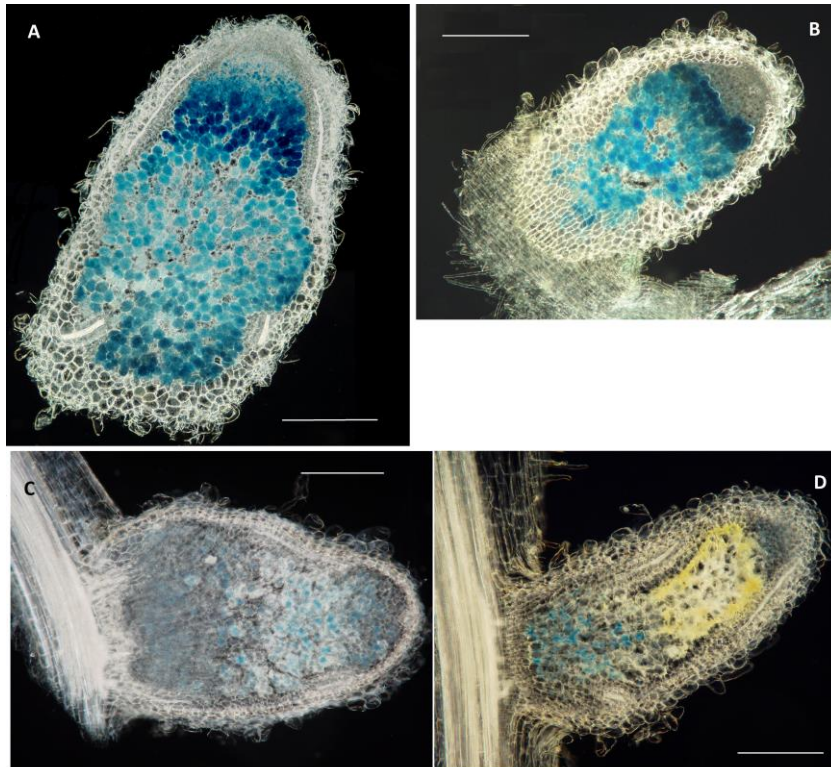
20. ábra: A: A17 vad típusú, B: NF-FN9285, C: 13U és D: *dnf2* mutáns növények gyökérzetének részlete. Nitrogénmentes tápközegben nevelkedtek a növények. A képek

8 héttel a csírák *S. medicae*-vel való lefertőzése után készültek. A mutáns növény gyökérzetét közelebbről megvizsgálva láthatóak a kis, nagy számban jelenlévő gümők.

méretarány: A, B: 2 mm, C,D: 1 mm. (Gödöllő, 2013.)

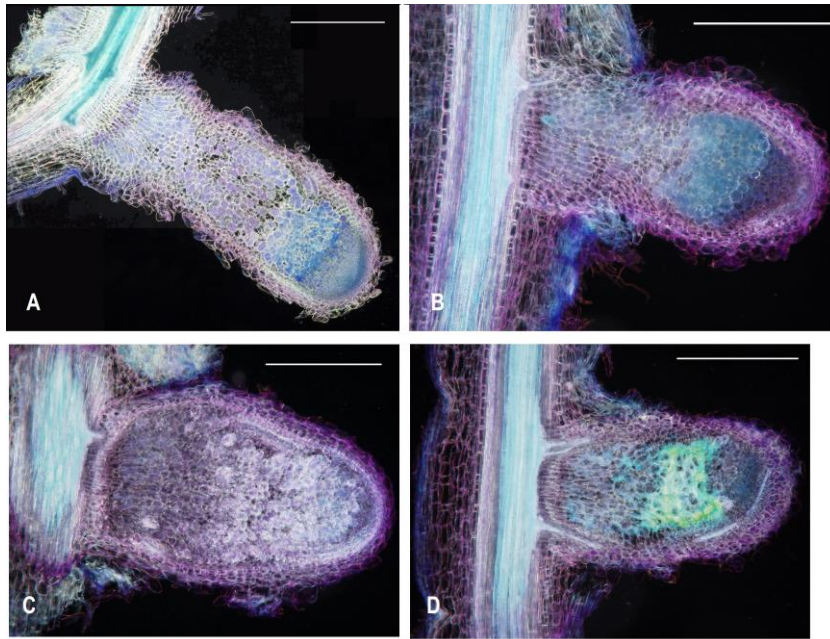
[M4] megjegyzést írt: Ide is kérem leírni, hogy mennyi idősek fertőzést követően, és hogy szimbiotikus körülmények között nőttek.

Annak eldöntésére, hogy a mutáns gümők a szimbiotikus kölcsönhatás mely fázisában szenvedtek hibát, gümömetszeteket készítettünk és vizsgáltuk a baktériumfertőzés mértékét a gümőkben. A növényeket egy *LacZ* markergént hordozó *S. medicae* törzsszel fertőztük, ami lehetővé tette a baktériumok jelenlétének vizsgálatát β -galaktozidáz aktivitás vizsgálatával (X-gal festés). A csírák kiültetése és rhizobiummal való lefertőzése után hat héttel NF-FN9285, *dnf2* és 13U mutáns növényekről, valamint a vad típusú A17 növényről vett gümőkől készült metszetek fénymikroszkópos képéből látszik (21. ábra), hogy a mutáns növényekben valóban más-más ponton akad el a szimbiózis kialakulásának folyamata, valamint mindhárom mutáns másként reagál a mikroba jelenlétére. A 13U és *dnf2* mutánsokban elvétve látható a baktériumok jelenlétére utaló kék elszíneződés. A *dnf2* mutánsban másodlagos sejtfalvastagodás is megfigyelhető főleg az infekciós zónában (21. ábra, sárgás elszíneződés). Az NF-FN9285 növény gümömetszete ehhez képest első ránézésre a vad típusú gümőhöz hasonló, azonban a nitrogénkötő zónában sokkal kevesebb baktérium jelenlétére utaló kék elszíneződés figyelhető meg. Ez arra enged következtetni, hogy ebben a mutánsban egy, a szimbiotikus nitrogénkötés folyamatának későbbi lépésében szerepet játszó gén szenvedett hibát, és ez a gén feltehetően a baktériumok fennmaradásában (perzisztencia) és a hatékony nitrogénkötésben játszik szerepet.



21. ábra: LacZ markergénnel rendelkező *S. medicae*-vel való fertőzés után 6 héttel készült *M. truncatula* növények 70 µm vastag gümőmetszetei X-Gal festést követően. A kék szín a baktériumok jelenlétére utal. A: Jemalong, B: NF-FN9285, C: 13U és D: *dnf2*. Lépték: A: 0,7 mm, B, C, D: 1 mm. (Gödöllő, 2013.)

Annak eldöntésére, hogy a mutáns növényekben megfigyelhető-e valamilyen erős patogén válaszreakció, a gümőmetszetek egy részét toluidinkék festésnek vettettük alá (22. ábrán). A toluidinkék festék a nukelinsavakat kékre színezi, így a baktériumokkal teli sejtek is kékes elszíneződést kapnak. A vad típusú gümőn és valamennyire az NF-FN9285 gümőn láthatóak a kékes sejtek, a másik két mutáns esetében alig. Míg az elsődleges sejtfalvastagodás rózsaszínes, jól látszik a *dnf2* mutáns gümőjén a másodlagos sejtfalvastagodás, melyet a festék türkizes-zöldre színez.



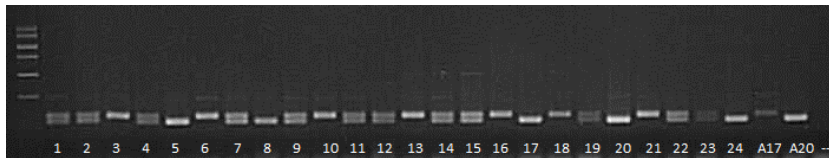
22. ábra: *S. medicae*-vel való fertőzés után 6 héttel készült toluidin kékkel festett 70 μ vastag gümőkmetzetek. A: Jemalong, B: NF-FN9285, C: 13U, D: *dnf2*. Lépték: 1 mm (Gödöllő, 2013.)

5.4. Az NF-FN9285 mutáns növény genetikai térképezése

Az NF-FN9285 növény az eddigi adatok alapján egy eddig nem ismert új mutáns. Terveink szerint a gént szeretnénk azonosítani, amihez a pozicionális klónozás módszerét szeretnénk használni. Ehhez szükség van a mutáns lókuszt minél pontosabb térképpozíciójának meghatározására. Ezért további genetikai markerek vizsgálatával tovább folytattuk a NF-FN9285 mutáns lókuszt térképezését. A markerek segítségével megállapíthatjuk, hogy a kromoszóma bizonyos pontján az egyes növények homozigóta mutáns, homozigóta vad típusú vagy heterozigóta genotípussal rendelkeznek. Minél több egyezést és kevesebb ellentmondást találunk a növények fenotípusa és genotípusa között, vagyis minél nagyobb mértékben

koszegregál a tulajdonság a genotípussal, annál közelebb kerülünk az adott tulajdonságban részt vevő mutáns gén genetikai térképpozíciójának pontosításához.

A térképezéshez a rendelkezésre álló *M. truncatula* markereket alkalmaztam (Choi és mtsai. 2004, Mun és mtsai.2006, www.medicago.org). A markerekre tervezett primerekkel PCR-t végeztem az F2 szegregáló populáció 24 növényének DNS mintáit felhasználva. A PCR termékeket gélelektroforézissel elválasztva, a fragmentek hosszkülönbsége alapján meghatározható volt, hogy az adott egyed homozigóta anyai, homozigóta apai vagy heterozigóta genotípussal rendelkezik az adott lókuszra nézve. Példaként a h2_49e16b markerrel történő genotípus meghatározást mutatom be a 23. ábrán.



23. ábra: Az F2 térképező populáció és a szülővonalak genotípusa a h2_49e16b markerre nézve. A felső fragmentek homozigóta A17 (a mutáns növények genetikai háttere) genotípust, az alsó fragmentek pedig homozigóta A20 genotípust, a dupla sáv pedig homozigóta genotípust jelent. (Gödöllő, 2013.)

Az NF-FN9285 mutáns kapcsán már kapcsolttságot találtunk több marker és mutáns fenotípus között a négyes kapcsolttsági csoporton. Ezen a kromoszómán folytattuk a térképezést, és a régióban található markerek segítségével a mutáns gén pozícióját pontosítani tudtuk. Azonban a kevés egyedből álló szegregáló populáció és azon belül a négy nem meghatározott fenotípusú egyed – és ebből következően a nem elegendő számú informatív rekombináns- határt szabott a térképpozíció pontosításának.

Az 24. ábra szemlélteti a kromoszómán elhelyezkedő markereket, s azt, hogy mely markerre nézve állapítottuk meg a szegregáló populáció genotípusát. Az egyedek genotípusát szintértékkel jelenítjük meg (Kiss et al 1998).

A két szimbiotikus nitrogénkötésben hibás növény vizsgálata során arra jutottunk, hogy az NF-FN9199 jelű mutánsban egy már azonosított gén, az *NSP2* gén szenvedett hibát, azonban a mutáció nem a gén kódoló szekvenciájában következett be. Eredményeink szerint azonban egy eddig azonosítatlan gén mutációja található meg az NF-FN9285 mutánsban, a négyes kapcsoltsági csoport középső régiójában. Ez a gén a szimbiotikus nitrogénkötés egy későbbi fázisában játszhat szerepet. A mutáns gén térképpozíciójának pontosításához először is a térképező populáció kibővítésére lesz szükség a jövőben.

ÖSSZEFOGLALÁS

Diplomadolgozatom témája a pillangósvirágú modellnövény, a *Medicago truncatula* és a *Sinorhizobium meliloti*, nitrogénkötő baktérium között kialakuló szimbiotikus nitrogénkötés vizsgálata volt. Munkám során olyan növényi géneket, ill. genetikai lokuszokat vizsgáltam, melyek részt vesznek ebben a folyamatban.

Munkám célja két, a szimbiotikus nitrogénkötésben hibát szenvedett növény mutáns vizsgálata, és a génazonosításhoz szükséges kezdeti lépések megtétele volt. Vizsgálataink egyik tárgya a NF-FN9199 (Noble Foundation – Fast Neutron) mutáns növény, ami nitrogénkötő gümő kialakítására képtelen, ún. Nod- mutáns. Ebben a növényben a szimbiózis kialakulása a szimbiotikus kölcsönhatás elején elakad. A másik szimbiotikus mutáns (NF-FN9285) gyökerén képződtek szimbiotikus gümők, de azokban nem zajlott hatékony nitrogénkötés, ún. Fix- vagy ineffektív gümők keletkeztek. Munkám célja a két szimbiotikus lokusz genetikai térképhelyének meghatározása, és a NF-FN9285 mutáns szimbiotikus fenotípusának vizsgálata volt.

Első lépésként meghatároztuk, a szimbiotikus fenotípust eredményező genetikai lokuszok térképhelyzetét. Mindkét mutáns fenotípust olyan genetikai régióba tudtuk térképezni, amelyben már korábban azonosított szimbiotikus gének is elhelyezkednek. Ezért meg kellett vizsgálnunk az új és a korábbi mutánsok allélikus viszonyait. Az F1 allélteszt eredménye az jelezte számunkra, hogy az NF-FN9199 és a korábban azonosított *nsp2* mutánsok ugyanabban a génben hibásak. A mutáció azonosításához elkezdtük az *NSP2* gén szekvenciájának meghatározását az NF-FN9199 mutánsban. Az NF-FN9285 mutánssal végzett allélteszt eredménye azt jelezte számunkra, hogy ez a mutáns nem allélikus a *dnf2* és 13U mutánsokkal, azaz feltehetően egy új szimbiotikus mutánst azonosítottunk.

Az NF9285 mutáns fenotípusának vizsgálatához vad típusú és mutáns növényeket egy *lacZ* markergént hordozó *S. medicae* törzssel fertőztem, és β -galaktozidáz festést követően vizsgáltam a mutáns gümők fenotípusát. Megállapítottuk, hogy a mutáns gümőkben a nitrogénkötő zónában jóval kevesebb baktérium található.

Az NF-FN9285 mutánsban hibás gén azonosítását hosszú távon pozicionális klónozással tervezzük meghatározni. Ehhez elkezdjük a mutáns lókuszt helyzetének meghatározását. Időhiány miatt egyelőre további F2 növények vizsgálatát még nem tudtuk elvégezni, ezért a 24 egyedből álló szegregáló F2 populáció DNS mintáit használtuk. A *M. truncatula* genetikai térkép molekuláris markereinek vizsgálatával pontosítottuk a NF-FN9285 mutáns lókuszt térképhez a 4-es kromoszómán (LG 4). A gén pontos helyzetének megállapításához és a gén izolálásához további munkára lesz szükség, melyhez először a szegregáló populáció kibővítésére lesz szükség.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontnak és a Növénygenomikai és Növény-mikroba Interakció Csoportnak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra, hogy náluk egy ilyen érdekes témán dolgozhassam.

Köszönöm a csoport vezetőjének, Dr. Kaló Péternek a lehetőséget, a tanítást, a sok segítséget, amit nyújtott és a sok időt, amit rám szánt.

Köszönöm az egész csoportnak, Szívós Istvánné Mártinak, Horváth Beatrixnak, Domonkos Ágotának, Miró Krisztinának, Gombár Anikónak és Kováts Gyöngyinek, hogy türelemmel és kedvességgel fordultak hozzám és mindig ott voltak, ha segítségre szorultam. Segítségük nélkül a diplomadolgozatom nem valósulhatott volna meg.

Szeretném megköszönni a szüleimnek, a testvéreimnek és az egész családomnak a támogatását.

Köszönöm a férjemnek, akinek a támogatása nélkül nem tarthatnék itt.

IRODALOMJEGYZÉK

Ané, J.M., Kiss, Gy. B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E. D., Ayax, C., Debellé, J. F., Baek, J. M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B. A., Long, S. R., Dénarié, J. Cook, D. R. (2004): *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *science*, 302: 1364-1367.

Belfield, E.J., Gan, X., Mithani, A., Brown, C., Jiang, C., Franklin, K., Alvey, E., Wibowo, A., Jung, M., Bailey, K., Kalwani, S., Ragoussis, J., Mott, R., Harberd, N.P. (2012): Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *GENOME RESEARCH* 22(7): 1306-1315

Fred, E. B., Baldwin, I. L. and McCoy, E. (1932): *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*, University of Wisconsin Press, Madison, Wis., p. 343.

George M. Garrity, ed. (July 26, 2005) [1984(Williams & Wilkins)]. *Introductory Essays. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2A* (2nd ed.). New York: Springer. p.304

Bolon, Y.T., Haun, W.J., Xu, W.W., Grant, D., Stacey, M.G., Nelson, R.T., Gerhardt, D.J., Jeddeloh, J.A., Stacey, G., Muehlbauer, G.J., Orf, J.H., Naeve, S.L., Stupar, R.M., Vance, C.P. (2011): Phenotypic and Genomic Analyses of a Fast Neutron Mutant Population Resource in Soybean. *PLANT PHYSIOLOGY* 156 (1): 240-253

Bourcy, M., Brocard, L., Pislariu, C.I., Cosson, V., Mergaert, P., Tadege, M., Mysore, K.S., Udvardi, M.K., 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(4): 1250-1261.

Chabaud, M., Lichtenzveig, J., Ellwood, S., Pfaff, T., Jourmet, E.P. (2007): Vernalization, crossings and testing for pollen viability. *The Medicago truncatula Handbook*: 1-13 M U, J EP, and S LW, eds., The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK.

Charpentier, M., Oldroyd, G. E. D. (2010): How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 556-564.

Choi, H., Kim, D., Uhm, T., Limpens, E., Lim, H., Mun, J., Kalo, P., Penmetsa, R., Seres, A., Kulikova, O. (2004): A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M-sativa*. *GENETICS* 2004, 166(3):1463-1502.

Den Herder, G., Parniske, M. (2009): The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current Opinion on Plant Biology*, 12: 491-499.

- Domonkos, A., Horvath, B., Marsh, J., Halasz, G., Ayaydin, F., Oldroyd, G.E.D., Kalo, P. (2013): The identification of novel loci required for appropriate nodule development in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 13(157)-
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.B. (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962–966.
- Gibson, A. H., & Nutman, P. S. (1960): Studies on the physiology of nodule formation. © Oxford University Press, 24 (4): 420-433.
- Huang B, Lv C, Zhao Y, Huang R (2012): A Novel Strain D5 Isolated from *Acacia confusa*. *PLoS ONE* 7(11): e49236. doi:10.1371/journal.pone.0049236
- Jones, K. M., Kobayashi, H., W. Davies, B. E. Taga, M & C. Walker, G. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 619-633.
- Li, X., Lassner, M., Zhang, Y. (2002): Deleteagen: A Fast Neutron Deletion Mutagenesis-Based Gene Knockout System for Plants. *Comparative and Functional Genomics*, 3(2): 158-160
- Kalo, P.; Gleason, C.; Edwards, A.; Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S. Jakab, J., Sims, S., Long S. R., Rogers. J., Kiss, G.B., Downie, J. A., Oldroyd, G.E.D. (2005): Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *SCIENCE*, 308(5729): 1786-1789
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, pp. 234–256.
- Limpens, E., Bisseling, T. (2003): Signalling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 343-350.
- Mitra, R.M., Gleason, C. A., Edwards, A., James Hadfield, J., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. D., Long, S. R. (2004): A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule: Gene identification by transcript-based cloning development. *PNAS*, 101(13): 4701–4705.
- Mun, J.H., Kim, D.J., Choi, H.K., Gish, J., Debelle, F., Mudge, J., Denny, R., Endre, G., Saurat, O., Dudez, A.M. (2006): Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: A resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps. *Genetics*, 172(4):2541-2555.
- Norris, D. O., *Plant Soil.*, 1965, 22, 143–166.
- Oldroyd, G.E.D., Long, S.R. (2003): Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *PLANT PHYSIOLOGY*, 131(3): 1027-1032
- Oldroyd, G. (2007): Root-nodule Symbiosis: Molecular Basis of Nodule Formation. *Encyclopedia of Life Sciences* DOI: 10.1002/9780470015902.a0020128.

Panara, F., Calderini, O., Porceddu, A. (2012): *Medicago truncatula* Functional Genomics – An Invaluable Resource for Studies on Agriculture Sustainability

R Cook, D. (1999): *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 301-304.

Rogers, C., Wen, J., Chen, R. Oldroyd, G.E.D. (2009): Deletion-Based Reverse Genetics in *Medicago truncatula*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 151(3): 1077-1086.

Sahgal, M. & N. Johri, B. (2006): Taxonomy of rhizobia: Current status. *Current Science*, 90(4): 486-487.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5467.

Sambrook J és Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual* vol. 1-3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Internetes hivatkozások:

http1

<http://www.nyf.hu/agrtud/sites/www.nyf.hu/agrtud/files/segedletek/Az%20emesztes%20anatomiaja%20es%20el%20ettana.pdf>. (2013.09.20.)

http2 <http://www.sulinet.hu/tlabor/biologia/szoveg/b04.htm> (2013. szeptember)

http3

http://www.mozaweb.hu/Lecke-Biologia-Biologia_12-A_letfontossagu_anyagok_korforgasa_a_termeszetenben-102660

http4 http://www.biochem.duke.edu/modules/biochem_raetz_lab/print.php?id=6

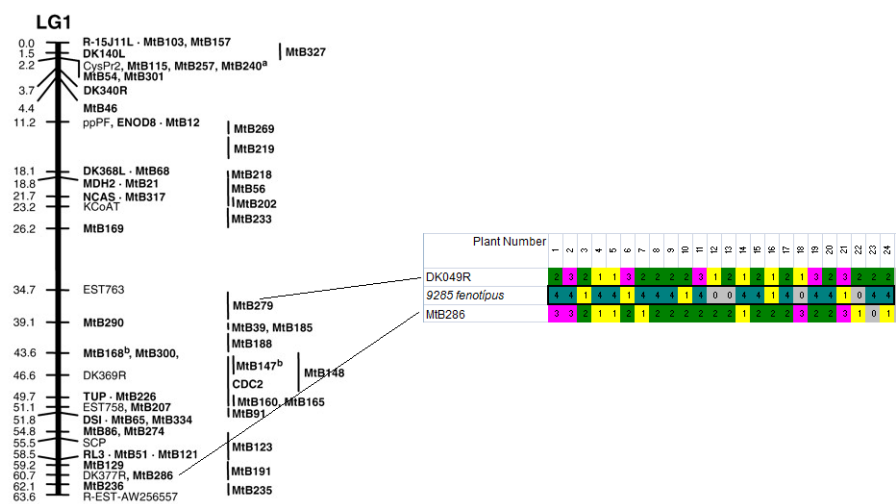
http5 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indeterminate_Nodule_Zones_Diagram.svg

http6 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Determinate_Nodule_Zones_Diagram.svg

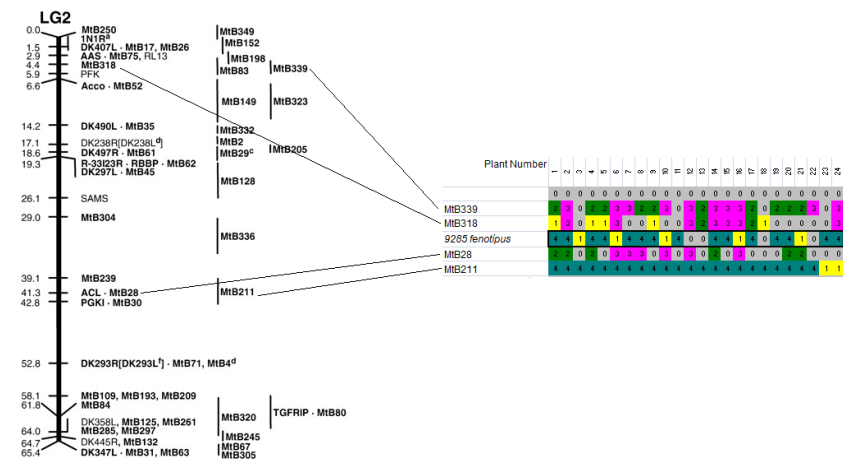
http7 <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/FNB.php>

http8 <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>

MELLÉKLETEK

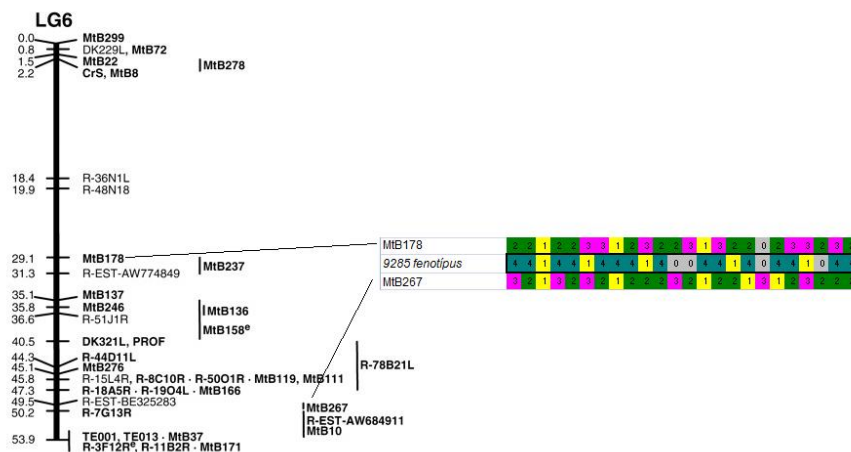


1. melléklet: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintértképe az első kapcsoltsági csoporton. Kapcsoltság genotípus és fenotípus között nincs.

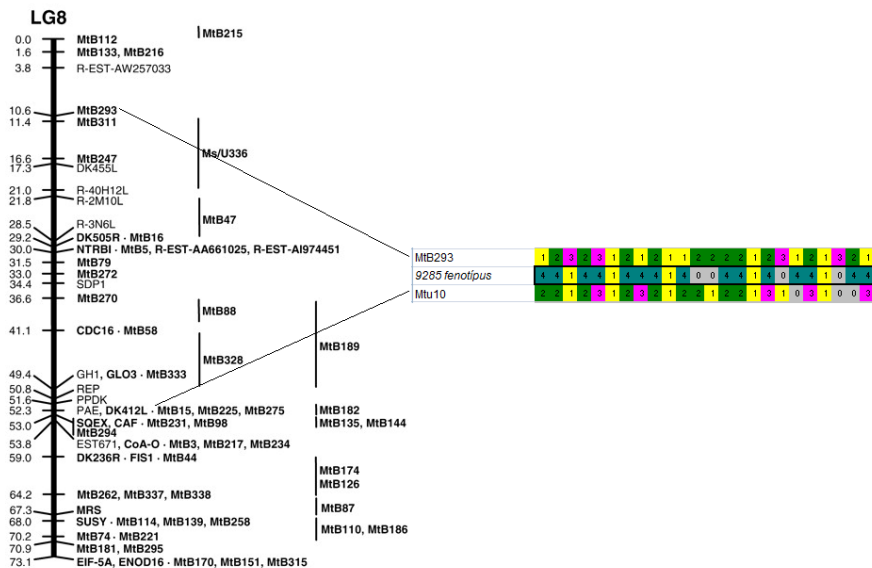


2. melléklet: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintértképe a kettes kapcsoltsági csoporton. Kapcsoltság genotípus és fenotípus között nincs.

4. melléklet: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintérképe a négyes kapcsoltsági csoporton. Kapcsoltság genotípus és fenotípus között nincsen.



5. melléklet: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintérképe a négyes kapcsoltsági csoporton. Kapcsoltság genotípus és fenotípus között nincsen.



6. melléklet: Az NF-FN9285 x A20 F2 szegregáló populáció szintérképe a négyes kapcsoltsági csoporton. Kapcsoltság genotípus és fenotípus között nincsen.