

AGNIESZKA ŻMIENKO

**PROFILOWANIE EKSPRESJI GENÓW ŁUBINU
WĄSKOLISTNEGO W BADANIACH NAD
SYMBIOTYCZNYM WIĄZANIEM AZOTU**

*Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia doktora*

POZNAŃ 2006

*Praca doktorska wykonana
w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Andrzeja B. Legockiego*

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Panu Prof. dr hab. Andrzejowi B. Legockiemu
za umożliwienie mi wykonywania pracy pod jego kierunkiem
oraz za wsparcie i opiekę podczas jej trwania

Panom dr Janowi Podkowińskiemu oraz dr Tomaszowi Stępkowskiemu
za wskazówki pomocne podczas wykonywania eksperymentów,
dyskusje i cenne uwagi

Panu dr hab. Markowi Figlerowiczowi
oraz Koleżankom i Kolegom z Pracowni Biologii Molekularnej Roślin
i Zespołu Biochemii Białka
za życzliwość, pomoc i serdeczną atmosferę

Mężowi
za wsparcie w dobrych i złych chwilach
oraz pomoc w komputerowym opracowaniu
przedstawionych wyników

Część doświadczalna tej pracy została zrealizowana

w ramach projektów KBN

nr 3 P04B 020 23 oraz

(częściowo) nr 2P04C 063 26

Mojej małej Córeczce, Dorotce

SPIS TREŚCI

A. WSTĘP	11
A.1. Wczesne etapy oddziaływań symbiotycznych.....	12
A.1.1. Rozpoznanie partnerów symbiozy	12
A.1.2. Infekcja i inwazja bakterii	14
A.1.3. Rola jonów wapnia we wczesnej odpowiedzi na czynnik Nod	16
A.1.4. Geny szlaku transdukcji sygnału inicjowanego przez czynnik Nod	17
A.2. Morfogeneza brodawki	23
A.2.1. Typy brodawek.....	23
A.2.2 Rola fitohormonów.....	25
A.2.3 Ekspresja genów wczesnych nodulin w czasie rozwoju brodawki	27
A.3. Metabolizm węgla i azotu w dojrzałej brodawce	30
A.4. Symbiotyczne wiązanie azotu a inne programy rozwojowe rośliny	34
A.5. Symbiotyczne wiązanie azotu w łubinie	37
A.6. Metody analizowania ekspresji genów na poziomie transkrypcji w badaniach rozwoju i funkcjonowania brodawek symbiotycznych.....	38
A.6.1. Hybrydyzacja subtrakcyjna.....	39
A.6.2. Wyszukiwanie zimnych łysinek	40
A.6.3. Amplifikacja różnicowa.....	41
A.6.4. Sekwencje EST i elektroniczny northern.....	42
A.6.5. Makro- i mikromacierze DNA	43
B. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY	46
C. MATERIAŁY I METODY	47
C.1. Wykaz stosowanych materiałów i odczynników	47

C.1.1. Materiał biologiczny	47
C.1.1.1. Rośliny.....	47
C.1.1.2. Szczepy bakteryjne.....	47
C.1.1.3. Wektory plazmidowe	48
C.1.1.4. AFGC Microarray Control Set.....	48
C.1.1.5. Znormalizowana biblioteka cDNA	49
C.1.2. Enzymy	50
C.1.3. Zestawy do wykonywania reakcji	50
C.1.4. Markery długości DNA	51
C.1.5. Oligonukleotydy	51
C.1.5.1. Startery uniwersalne.....	51
C.1.5.2. Startery do amplifikacji i sekwencjonowania indywidualnych klonów	52
C.1.6. Inne materiały i odczynniki	54
C.1.7. Pożywki	55
C.1.7.1. Pożywki do hodowli bakterii.....	55
C.1.7.2. Pożywka do hodowli roślin	56
C.1.8. Roztwory	57
C.1.8.1. Roztwory do izolacji całkowitego RNA z roślin	57
C.1.8.2. Roztwory do elektroforezy DNA	58
C.1.8.3. Roztwory do elektroforezy RNA	58
C.1.8.4. Roztwory do transferu i hybrydyzacji.....	59
C.1.8.5. Pozostałe roztwory	60
C.1.9. Ważniejsza aparatura	60
C.2. Metody	61
C.2.1. Hodowla roślin	61
C.2.2. Hodowla bakterii	62
C.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	62
C.2.2.2. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> bv. <i>genistaeum</i>	62
C.2.3. Izolacja roślinnego RNA	63
C.2.3.1. Metoda GHCH-LiCl.....	63
C.2.3.2. Metoda GTC-CsCl	63
C.2.3.3. Metoda GTC-PVP-LiCl	64

C.2.3.4. Metoda RNeasy	64
C.2.4. Izolacja całkowitego DNA z roślin.....	65
C.2.5. Izolacja plazmidów z komórek <i>E. coli</i>	65
C.2.6. Analiza spektrofotometryczna kwasów nukleinowych.....	65
C.2.7. Elektroforeza DNA.....	65
C.2.8. Elektroforeza RNA.....	66
C.2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	66
C.2.10. Amplifikacja PCR	67
C.2.11. Oczyszczanie produktów amplifikacji PCR	68
C.2.12. Znakowanie radioaktywne ss cDNA.....	69
C.2.13. Znakowanie radioaktywne produktów PCR.....	71
C.2.14. Hybrydyzacja kolonijna	71
C.2.15. Hybrydyzacja makromacierzy DNA o niskiej gęstości	72
C.2.16. Hybrydyzacja makromacierzy DNA o wysokiej gęstości	73
C.2.17. Hybrydyzacja Northern.....	74
C.2.18. Ustalanie końca 5' transkryptu	75
C.2.19. Klonowanie produktów PCR do wektora plazmidowego	76
C.2.20. Sekwencjonowanie DNA.....	77
C.2.21. Komputerowa obróbka i analiza danych.....	79
D. WYNIKI.....	80
D.1. Selekcja genów o ekspresji modulowanej w symbiozie	80
D.1.1. Optymalizacja procedur izolacji RNA i znakowania cDNA	81
D.1.2. Etap I analizy różnicowej	83
D.1.3. Etap II analizy różnicowej.....	83
D.1.4. Etap III analizy różnicowej	85
D.1.5. Sekwencjonowanie insertów.....	86
D.1.6. Przeszukanie baz danych.....	88
D.2. Otrzymanie cDNA reprezentujących geny markerowe.....	94
D.2.1. Losowy wybór klonów ze znormalizowanej biblioteki cDNA.....	94

D.2.2. Amplifikacja RT PCR w oparciu o dane sekwencyjne	
genów z innych roślin	102
D.2.2.1. Markery metabolizmu węgla i azotu.....	106
D.2.2.2. Markery procesu brodawkowania.....	110
D.2.2.3. Markery szlaku transdukcji sygnału inicjowanego przez czynnik Nod	111
D.2.2.4. Pozostałe markery	112
D.3. Analiza częstości występowania sekwencji EST w bibliotekach LA01 i LA02.....	113
D.4. Ekspresja genów w trakcie rozwoju brodawki.....	118
D.4.1. Analiza ekspresji przy pomocy makromacierzy cDNA.....	118
D.4.1.1. Analiza pojedynczych filtrów	120
D.4.1.2. Normalizacja danych.....	121
D.4.1.3. Porównanie filtrów eksperymentalnego i kontrolnego dla danego punktu czasowego	123
D.4.2. Profile ekspresji genów	123
D.4.2.1. Geny markerowe (LA10)	124
D.4.2.2. Geny zidentyfikowane poprzez przeszukanie różnicowe (LA02)	124
D.4.2.3. Geny losowo wybrane (LA01).....	136
D.4.3. Analiza ekspresji przy pomocy hybrydyzacji northern	137
D.5. Indywidualna analiza sekwencji wybranych genów	140
D.5.1. LA02EST010.....	140
D.5.2. LA02EST004 / LA02EST005/ LA02EST043	146
D.5.3. LA02EST028.....	151
D.5.4. LA10SEQ090	153
D.5.5. LA02SEQ091	156
D.6. Analiza filogenetyczna genu NFR5 w łubinach	161
D.6.1. Izolacja genomowego DNA i sekwencjonowanie domeny receptorowej	161
D.6.2. Drzewo filogenetyczne NFR5	161

E. DYSKUSJA	164
E.1. Identyfikacja genów zaangażowanych w symbiotyczne	
wiązanie azotu w łubinie	164
E.1.1. Skuteczność zastosowanej metody selekcji	164
E.1.2. Biblioteka LA02	168
E.1.3. Geny indukowane w trakcie brodawkowania.....	170
E.2. Geny markerowe.....	175
E.2.1. Kolekcja LA01	176
E.2.2. Kolekcja LA10	177
E.3. NFR5 jako marker w analizie filogenetycznej.....	183
F. PODSUMOWANIE	186
Literatura	188
Wykaz tabel i rysunków	212

A. WSTĘP

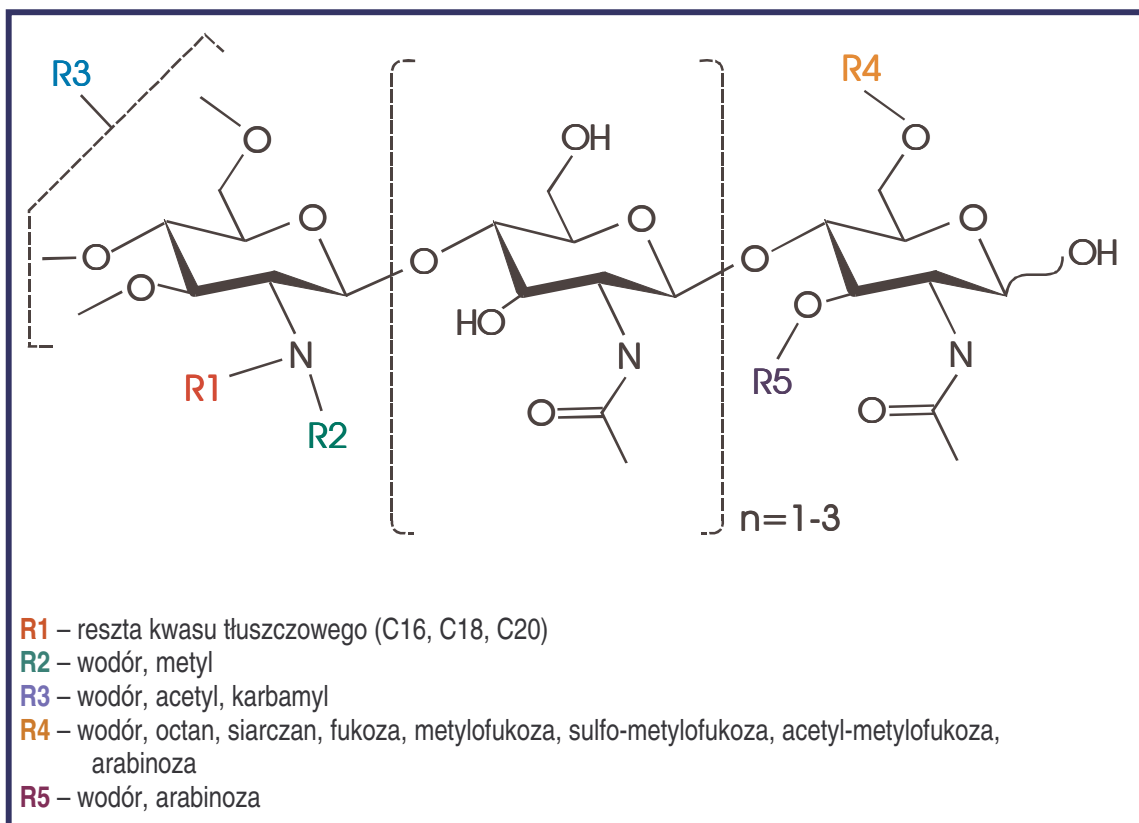
Azot, który jest jednym z podstawowych pierwiastków tworzących organizmy żywe, występuje głównie w atmosferze, w niereaktywnej formie cząsteczkowej N_2 . Dostępność przyswajalnych form tego pierwiastka w biosferze jest niezbędnym warunkiem zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie organizmów. Biologiczna redukcja azotu atmosferycznego przeprowadzana jest wyłącznie przez niektóre organizmy prokariotyczne. Wśród nich szczególną niszę ekologiczną zajmują Gram-ujemne bakterie glebowe z rodzajów *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium*, potocznie zwane rizobiami. Mają one zdolność do oddziaływań symbiotycznych z roślinami należącymi do rodziny motylkowatych (*Leguminosae*). Rozwój symbiozy roślin motylkowatych z rizobiami jest złożonym i wieloetapowym procesem, prowadzącym do utworzenia nowych organów roślinnych – brodawek korzeniowych, skolonizowanych przez mikrosymbionta. Dojrzałe brodawki są miejscem wiązania azotu atmosferycznego, a także wymiany metabolitów pomiędzy partnerami symbiozy. Dzięki partnerowi roślinnemu, dostarczającemu energię niezbędną do wiązania azotu, a także zapewniającemu ochronę dla wrażliwego na tlen kompleksu bakteryjnej nitrogenazy, symbiotyczne wiązanie azotu stanowi jedno z najbardziej efektywnych źródeł związanej formy tego pierwiastka w biosferze.

Znaczenie ekologiczne i gospodarcze tego procesu powoduje, że od kilku już dziesięcioleci trwają prace nad poznaniem mechanizmu oddziaływań symbiotycznych. Jednocześnie poszukuje się odpowiedzi na pytanie, dlaczego symbioza z rizobiami jest tak unikalna - jak dotąd opisano tylko jeden przykład rośliny (*Parasponia*) spoza rodziny *Leguminosae* zdolnej do tego typu interakcji. Proces rozwoju symbiotycznych brodawek korzeniowych stał się także doskonałym modelem do badania organogenezy oraz mechanizmów odróżnicowywania komórek u roślin.

A. 1. Wczesne etapy oddziaływań symbiotycznych

A. 1.1. Rozpoznanie partnerów symbiozy

Zawiązanie symbiozy jest możliwe w warunkach niedoboru przyswajalnych form azotu w glebie, przy zachowanej zdolności fotosyntetycznej rośliny i rozpoczyna się od preinfekcji - wzajemnego rozpoznania przyszłych partnerów. Etap ten polega na wymianie chemicznych sygnałów pomiędzy rośliną i bakterią – związki obecne w eksudatach korzeni roślin, głównie flawonoidy i izoflawonoidy, wywołują dodatnią chemotaksję bakterii oraz wiążą się do konstytutywnie produkowanego przez bakterie białka NodD. W obecności tych induktorów białko NodD, należące do rodziny aktywatorów transkrypcji *LysR*, aktywuje ekspresję bakteryjnych genów *nod* [Mulligan i Long 1985, Rolfe 1988], czego następstwem jest synteza tzw. czynnika Nod (Rys. 1).



Rysunek 1. Schemat ogólny struktury czynnika Nod (wg: Jakubowska i Kowalczyk [1998], zmienione)

Rdzeń tego związku stanowi 3-5 reszt N-acetylo-D-glukozyaminowych, połączonych wiązaniami β-1,4 glikozydowymi. Powstaje on w wyniku ekspresji tzw. wspólnych genów brodawkowania (*nodABC*). W pozycji C-2 reszty glukozyaminowej usytuowanej na nieredukującym końcu cząsteczki dołączony jest łańcuch aminoacylowy o różnej

długości (C16, C18, C20) i zróżnicowanym stopniu nasycenia wiązań węgiel - węgiel. Ten podstawowy szkielet jest dodatkowo modyfikowany w charakterystycznych dla danego czynnika Nod pozycjach poprzez acetylacje, metylacje, sulfonowanie, dołączanie reszt cukrowych, np. fukozy czy arabinozy oraz innych podstawników. Za dołączanie konkretnych grup chemicznych odpowiedzialne są tzw. geny specyficzności gospodarza (geny *hsn*), występujące w różnych zestawach, w zależności od szczepu bakterii [Lerouge i wsp. 1990; Roche i wsp. 1991a; Mergaert i wsp. 1993; Debelle i wsp. 1996].

Jak wykazano, to właśnie percepcja czynnika Nod, będącego silnym morfogenem, indukuje wczesne odpowiedzi rośliny, poprzedzające infekcję rizobiami. Podanie oczyszczonego czynnika Nod, nawet przy braku obecności bakterii w podłożu, jest wystarczającym bodźcem do wywołania deformacji włośników, ekspresji roślinnych genów brodawkowania (nodulin) i zainicjowania tworzenia brodawki korzeniowej (por. dalej) [Lerouge i wsp. 1990; Roche i wsp. 1991b; Denarie i wsp. 1996; Esseling i wsp. 2003]. Obecność bakterii wymagana jest do prawidłowego przebiegu dalszych etapów brodawkowania (wzrost nici infekcyjnych i zakażenie komórek brodawki). Z kolei mutanty delecyjne *nodABC⁻* szczepu *Rhizobium* sp. NGR234, nie wytwarzające czynnika Nod, nie są zdolne ani do wywołania wczesnych odpowiedzi, ani do zainfekowania gospodarza. Infekcyjność bakterii przywracała inokulacja korzeni mutantami *nodABC⁻*, połączona z jednoczesnym podaniem czynników Nod charakterystycznych dla tego szczepu [Relic i wsp. 1993].

Określony szczep bakterii ma najczęściej zdolność infekowania roślin należących do kilku rodzajów, jednak w pewnych przypadkach zakres gospodarza bywa bardzo wąski lub niezwykle szeroki, np. *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii zakaża wyłącznie gatunki z rodzaju *Trifolium*, a szczep *Rhizobium* sp. NGR234 może zakażać kilkadziesiąt rodzajów roślin [Guerts i Franssen 1996, Pueppke i Broughton 1999]. O specyficzności gatunkowej tych interakcji decyduje w szczególności struktura czynnika Nod, zdeterminowana przez rodzaj i położenie podstawników w cząsteczce. Z reguły dany szczep bakterii ma zdolność wytwarzania całego spektrum czynników Nod o zbliżonej strukturze, jednak można wyróżnić wśród nich charakterystyczne modyfikacje, kluczowe dla prawidłowego rozpoznania mikrosymbionta przez roślinę. Przykładowo, obecność grupy sulfonowej na końcu redukującym czynnika Nod u

Sinorhizobium meliloti jest niezbędna do skutecznego zakażenia lucerny (*Medicago sativa*) [Roche i wsp. 1991a]. Zmiana struktury czynnika Nod, spowodowana np. mutacją w jednym z genów *nod*, odpowiadających za dołączenie konkretnej grupy chemicznej do szkieletu lipooligosacharydowego, może spowodować przesunięcie zakresu gospodarza. Zastąpienie genu *nodE* u szczepu *R. leguminosarum* bv. trifolii homologicznym genem z *R. leguminosarum* bv. viciae, przesuwało zakres gospodarza z rodzaju *Trifolium* na *Vicia* i *Lathyrus* [Vanrhijn 1995; Spaink 1989]. Z kolei wprowadzenie do genomu *R. leguminosarum* bv. viaciae genu *nodZ*, kodującego fukozylotransferazę i odpowiedzialnego za dołączenie reszty fukozy do cząsteczki czynnika Nod, umożliwiało bakteriom zakażanie korzeni *Macroptilium*, *Vigna* i *Glycine* [Lopez-Lara i wsp. 1996]. Również długość rdzenia oligosacharydowego ma wpływ na efektywność rozpoznawania czynnika Nod przez roślinę.

A. 1.2. Infekcja i inwazja bakterii

Zdolność do reakcji na obecność bakterii symbiotycznych w środowisku (równoznaczna z wrażliwością na obecność czynnika Nod) posiadają jedynie młode włośniki, o prawie zakończonym wzroście [Heidstra i wsp. 1994; Sieberer i Emons 2000]. Już po kilkunastu minutach od podania swoistego czynnika Nod można zaobserwować pierwsze zmiany w morfologii tych włośników w postaci zgrubienia ich wierzchołkowej części, a następnie (po jednej do czterech godzin) deformacji i zwijania się w kształt pastorału. Doświadczenia Esselinga i wsp. [2003] przeprowadzone na *Medicago truncatula* pokazują, że zwijanie włośników jest reakcją fizjologiczną na lokalne podanie czynnika Nod. Jest to reakcja specyficzna – nie wywołuje jej podanie czynnika Nod pozbawionego charakterystycznej grupy sulfonowej ani tetrameru N-acetyloglukozoaminy (szkieletu cząsteczki czynnika Nod), a także rozpuszczalnika - wody. Proponuje się, że deformacja włośników polega na zmianie kierunku ich wzrostu wierzchołkowego, a prowadzi do tego następująca sekwencja wydarzeń [Esseling i wsp. 2003; Gage 2004]:

1. Czynniki Nod powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Ca^{2+} . Jest to efekt lokalny, ponieważ czynniki Nod jest immobilizowany na powierzchni ściany komórkowej [Goedhardt i wsp. 2000].

2. Zmieniony gradient jonów wapnia w komórce wpływa na reorientację kierunku transportu i egzocytozy pęcherzyków błonowych przez filamenty aktynowe, do miejsca podwyższonego stężenia jonów Ca^{2+} .
3. Ciągłe punktowe wytwarzanie czynnika Nod przez przytwierdzone do powierzchni włósnika bakterie wywołuje dalszą reorientację, a przez to efekt zwijania.

W zgodzie z tym założeniem pozostają obserwowane rearanżacje mikrofilamentów aktynowych i mikrotubul, rozpoczynające się po 3-10 min od podania czynnika Nod [Cardenas i wsp. 1998; de Ruijter i wsp. 1999; Weerasinghe i wsp. 2003; Gage 2004]. Udział elementów cytoszkieletu i gradientu jonów wapnia w utrzymaniu prawidłowego wzrostu wierzchołkowego włósników również potwierdza opisany model deformacji włósników [Bibikova i wsp 1997, 1999].

Zwijanie włósników prowadzi do utworzenia kieszeni, w której zostają zamknięte bakterie. Wnikają one następnie do wnętrza korzenia dzięki lokalnej lizie ściany komórkowej i inwaginacji roślinnej błony komórkowej. W czasie tego procesu roślinne struktury błonowe otaczają komórki bakterii i zamykają wewnątrz, tworząc tak zwane nici infekcyjne. Rizobia pozostaną oddzielone od komórki gospodarza strukturami błonowymi pochodzenia roślinnego przez cały okres trwania symbiozy, aż do degradacji brodawki.

W wyniku wzrostu wierzchołkowego i rozgałęziania nici infekcyjne przerastają epidermę, a następnie korę korzenia, transportując rozmnażające się wewnątrz nich bakterie w stronę zawiązka brodawki (primordium). Powstaje on na skutek odróżnicowania komórek kory pierwotnej korzenia, położonych naprzeciwko pól protoksylemu i aktywacji genów wczesnych nodulin - białek zaangażowanych w rozwój brodawki i proces infekcji bakteryjnej. Czynnikiem wyzwalającym aktywność podziałową komórek kory jest czynnik Nod, a rozwój primordium rozpoczyna się już w kilka godzin po percepcji tego sygnału. Gdy wydłużająca się nić infekcyjna dociera do zawiązka, rizobia pobierane są przez komórki na zasadzie endocytozy i otaczone tzw. błoną peribakteroidalną. W ten sposób tworzą się symbiosomy – pseudoorganelle, w których rizobia różnicują się w bakteroidy – formę zdolną do redukcji azotu atmosferycznego.

A.1.3. Rola jonów wapnia we wczesnej odpowiedzi na czynnik Nod

Najwcześniejszą zaobserwowaną reakcją młodych włośników korzenia na podanie czynnika Nod (już po kilku sekundach) jest napływ do komórek jonów Ca^{2+} z przestrzeni otaczającej włośniki (ang. *calcium flux*). Ten początkowy napływ jonów Ca^{2+} ma charakter dwufazowy (prowadzone na bieżąco pomiary zmian stężenia tych jonów we włośnikach po podaniu czynnika Nod pozwoliły zaobserwować dwa następujące po sobie piki) [Shaw i Long 2003]. Wzrost stężenia niezwiązanego wapnia w cytoplazmie prawdopodobnie powoduje aktywację kanałów anionowych, prowadząc do kolejnych zmian: wypływu jonów Cl^- i przejściowej depolaryzacji błony komórkowej (po 30-60 s) [Ehrhardt i wsp. 1992; Kurkdijan 1995; Felle i wsp. 1998]. Depolaryzacja jest następnie zatrzymywana na skutek wypływu jonów K^+ , a aktywność pompy protonowej przywraca potencjał spoczynkowy błony komórkowej po 25 – 30 minutach, nawet przy ciągłej obecności czynnika Nod [Felle i wsp. 1998, Cardenas i wsp. 2000]. W reakcji na czynnik Nod następuje także natychmiastowy (po 15 s) wzrost pH wewnątrzkomórkowego o 0,2 – 0,3 pH [Felle i wsp. 1996].

Podwyższony poziom jonów wapnia w komórce utrzymuje się przez co najmniej 6 minut. Następnie (po 10 - 25 minutach od podania czynnika Nod) obserwowane są oscylacje stężenia jonów Ca^{2+} (ang. *calcium spiking*). Są one wynikiem zmiany rozkładu wewnątrzkomórkowych zapasów wapnia i utrzymują się przez kilkadziesiąt minut [Ehrhardt i wsp. 1996; Shaw i Long 2003]. Zastosowanie technik obrazowania z użyciem dwóch barwników fluorescencyjnych pozwoliło wykazać na przykładzie *M. truncatula*, że reakcja ta jest niezależna od początkowego napływu jonów Ca^{2+} [Shaw i Long 2003]. Oscylacje wywoływane są przy bardzo niskich (nawet 1 – 10 pM) stężeniach czynnika Nod, podczas gdy napływ jonów Ca^{2+} wymaga stężenia 10 nM. Również miejsce inicjacji i sposób rozchodzenia tych sygnałów w komórce są odmienne – oscylacje są inicjowane w pobliżu jądra i propagowane w kierunku szczytowej części włośnika, natomiast napływ jonów Ca^{2+} obserwowany był początkowo w peryferyjnych regionach komórki i rozprzestrzenił się w kierunku jądra. Ponadto komórki, w których poprzez podanie czynnika Nod w stężeniu 1 nM, wywołano oscylacje (ale nie początkowy napływ) jonów Ca^{2+} , w dalszym ciągu zachowują zdolność do reakcji w postaci gwałtownego napływu jonów wapnia po zwiększeniu stężenia do 10 nM. Z kolei podanie czynnika Nod pozbawionej grupy

sulfonowej na końcu redukującym powodowało wystąpienie oscylacji, ale nie początkowego napływu jonów wapnia [Shaw i Long 2003].

Jony wapnia powszechnie funkcjonują jako wtórne przekaźniki w wielu szlakach sygnalizacji u eukariontów, a także prokariontów [Sanders i wsp. 1999; Dominiguez 2004; Ward 2004; Bothwell i Ng 2005]. Ponieważ zmiany stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach poddanych działaniu czynnika Nod stanowią najwcześniejszą zaobserwowaną reakcję fizjologiczną, możliwe, że są one komponentem szlaku transdukcji indukowanego przez sygnał bakteryjny [Felle i wsp. 1999]. Za taką rolę jonów wapnia w symbiozie przemawia też istnienie mutantów niezdolnych do brodawkowania, u których nie wykrywa się oscylacji poziomu Ca^{2+} w odpowiedzi na czynnik Nod [Wais i wsp. 2000; Shaw i Long 2003]. Badania Pingret'a i wsp. [1998] sugerują zaś, że powyżej tego przekaźnika działa układ transdukcji sygnału związany z białkami typu G i fosfolipazą.

A.1.4. Geny szlaku transdukcji sygnału inicjowanego przez czynnik Nod

Obserwacje, że czynnik Nod w sposób specyficzny i w bardzo niskich stężeniach (10^{-9} – 10^{-12} M) indukuje wszystkie reakcje typowe dla wczesnych stadiów symbiozy, wskazywały na istnienie roślinnego receptora o wysokim powinowactwie. Poszukiwano go między innymi wśród lektyn – białek wiążących oligosacharydy bakteryjne. Doniesienia wskazujące na lektynę o właściwościach apyrazy jako obiecującego kandydata, na kilka lat skupiły uwagę grup badawczych na tej klasie białek [Etzler i wsp. 1999]. Opisane białko Db-LNP z *Dolichos biflorus*, zlokalizowane na powierzchni włóśników korzeniowych i mające zdolność wiązania czynników Nod ze szczepów efektywnie zakażających tą roślinę, reprezentuje specyficzną dla roślin motylkowatych klasę apyraz [Roberts i wsp. 1999]. Deficyt związanych form azotu w podłożu powoduje wzrost poziomu białka Db-LNP w korzeniach, a związanie czynnika Nod indukuje jego aktywność ATP-azową [Etzler i wsp. 1999; Kalsi i Etzler 2000]. U soi zidentyfikowano ortolog genu *Db-LNP*, nazwany *GS52* [Day i wsp. 2000]. Poziom transkryptów *GS52* wzrasta przejściowo w ciągu kilku godzin od inokulacji symbiotycznym szczepem. Wykazano także, że przeciwciała skierowane przeciwko białkom Db-LNP i GS52 hamowały zdolność roślin do brodawkowania w odpowiedzi na obecność symbiotycznych szczepów bakterii [Etzler i wsp. 1999, Day i wsp. 2000].

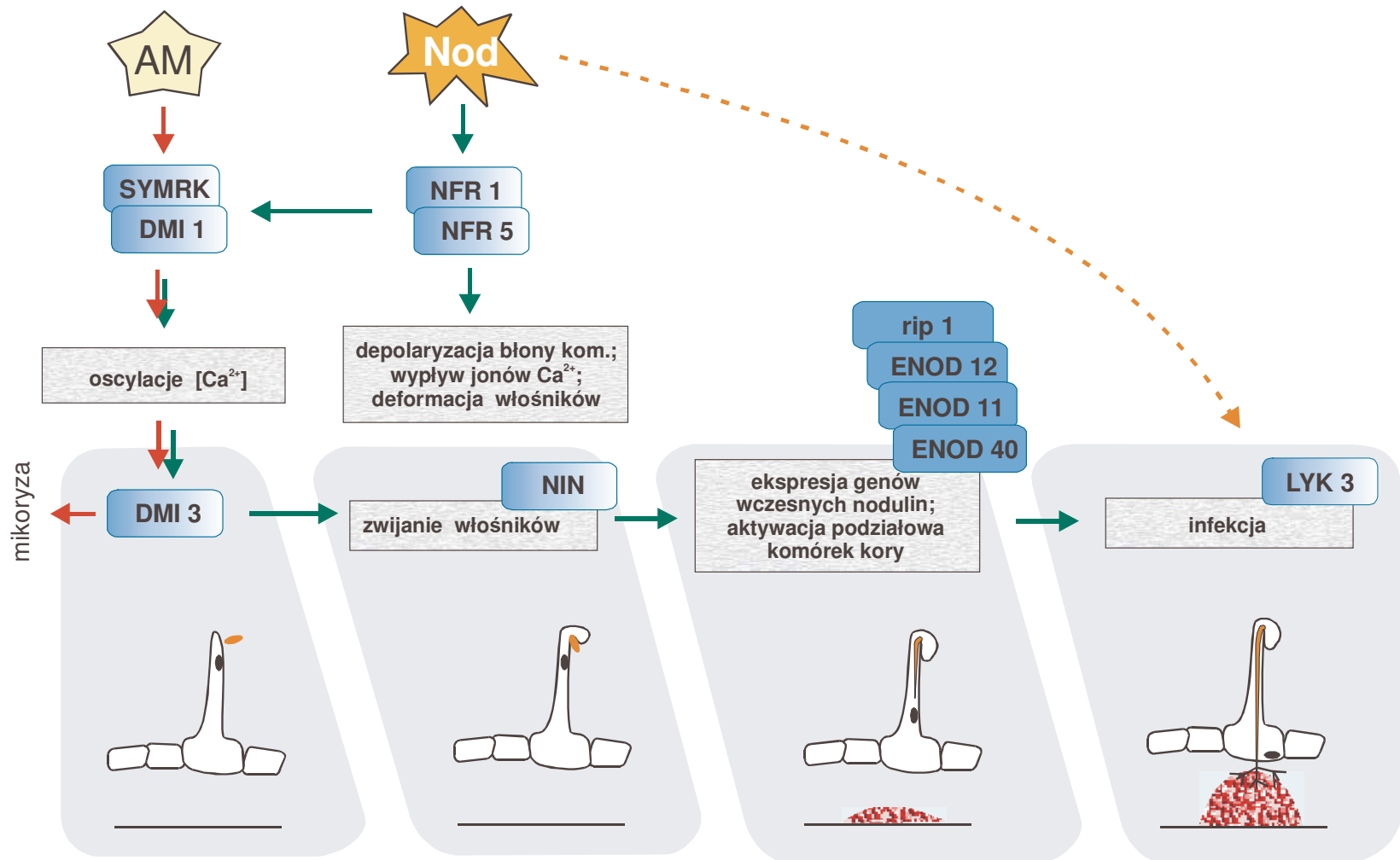
Jednak, choć powyższe wyniki wskazują na udział lektyn o właściwościach apyraz we wczesnych oddziaływaniach symbiotycznych, późniejsze badania prowadzone na *M. truncatula* wykluczyły możliwość, by pełniły one rolę receptorów czynnika Nod [Cohn i wsp. 2001; Navarro-Gochicoa i wsp. 2003].

Ostateczną identyfikację (jak się obecnie wydaje) receptorów czynnika Nod umożliwiły badania mutantów roślin motylkowatych. Mutanty *Lotus japonicus nfr1* i *nfr5* są niezdolne do odpowiedzi na obecność bakterii symbiotycznych lub oczyszczonego czynnika Nod [Radutoiu i wsp. 2003; Madsen i wsp. 2003], przy niezmienionej wrażliwości na niepodstawione oligosacharydy chitynowe. Jedyną znaną reakcją fizjologiczną zaobserwowaną u mutantu *nfr1* jest, w zależności od allelu, powolna i osłabiona alkalizacja lub zakwaszenie przestrzeni pozakomórkowej włośników, przypominające odpowiedzi na niespecyficzne oligosacharydy. Mutant *nfr5* nie wykazuje żadnych odpowiedzi fizjologicznych na czynnik Nod. Komplementacja zmutowanych genów *NFR1* i *NFR5* przywraca pełną zdolność do symbiozy z rizobiami w roślinach transgenicznym [Radutoiu i wsp. 2003; Madsen i wsp. 2003].

Wiele mutantów symbiotycznych (np. *symRK*, por. niżej) jest również niezdolnych do nawiązania symbiozy z grzybami mikoryzowymi, a szereg genów zaliczanych do wczesnych nodulin ulega specyficznej indukcji także w czasie mikoryzy arbuskularnej [Duc i wsp. 1989; van Rhijn i wsp. 1997; Catoira i wsp. 2000]. Wskazuje to na istnienie wspólnego etapu transdukcji sygnału w obu rodzajach symbiozy (Rys. 2). W świetle tych odkryć niezwykle istotne jest spostrzeżenie, że mutanty *nfr1* i *nfr5* zachowują pełną zdolność do mikoryzy arbuskularnej. Geny *NFR1* i *NFR5* odgrywają zatem zasadniczą rolę w inicjowaniu najwcześniejszych wykrywalnych reakcji komórkowych na czynnik Nod, poprzedzających etap wspólnych odpowiedzi symbiotycznych (ang. *common symbiotic pathway*). Potwierdzają to analizy podwójnych mutantów *nfr1 – symRK* [Radutoiu i wsp. 2003].

Białka kodowane przez geny *NFR1* i *NFR5* to kinazy typu receptora (RLK, ang. *receptor-like kinase*), które w swojej domenie zewnątrzkomórkowej posiadają odpowiednio dwa lub trzy motywy LysM (Rys. 3). Motywy te występują powszechnie u bakterii (między innymi w enzymach degradujących ściany komórkowe – lizynie i muramidazie) oraz w niektórych białkach eukariotycznych, w tym chitynazach glonów i

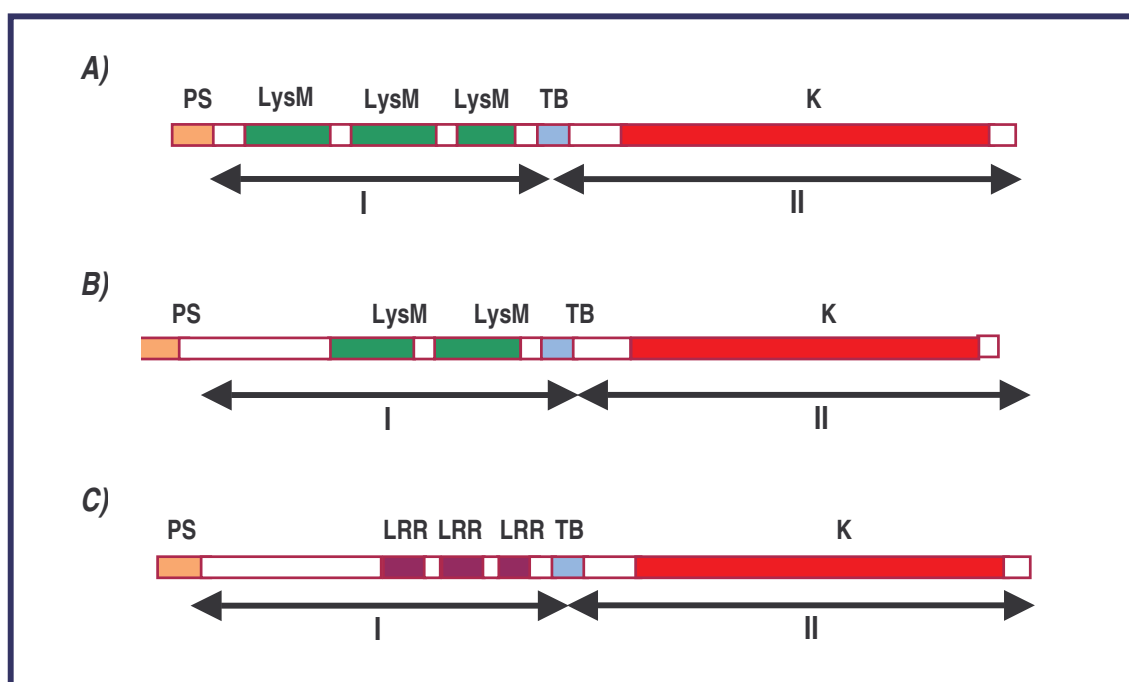
A)



B)

Rysunek 2. Wczesne etapy odpowiedzi rośliny na obecność mikrosymbionta bakteryjnego. (A) białka i mechanizmy zaangażowane w transdukcję sygnału i inicjację brodawkowania; (B) zmiany morfologiczne. Nod – czynnik Nod, AM – niezidentyfikowany sygnał produkowany przez grzyby mikoryzowe. Podwójne strzałki wyznaczają wspólny etap sygnalizacji w symbiotycznym wiązaniu azotu i mikoryzie arbuskulanej.

nicieni. Wykazano, że domena z motywem LysM autolizyny z *Lactococcus lactis* ma zdolność wiązania peptydoglikanów – związków wykazujących strukturalne podobieństwo do rdzenia czynnika Nod [Steen i wsp. 2003]. W świetle tych danych bardzo prawdopodobne wydaje się, że domeny LysM białek NFR1 i NFR5 mają zdolność wiązania czynnika Nod, choć nadal wymaga to potwierdzenia. Domena wewnątrzkomórkowa białka NFR5 nie posiada typowej dla kinaz konserwatywnej pętli aktywacyjnej. Aktywność kinazowa tego białka może być zatem wyzwalana bezpośrednio przez percepcję ligandu (czynnika Nod). Możliwe jest również, że NFR1 i NFR5 inicjują kaskadę transdukcji sygnałów jako heterodimery, gdzie związanie czynnika Nod przez receptorową domenę NFR5 powoduje aktywację domeny kinazowej białka NFR1 [Radutoiu i wsp. 2003; Madsen i wsp. 2003].



Rysunek 3. Schemat struktury białek NFR5 (A), NFR1 i Lyk3 (B) oraz SYMRK (C). PS – peptyd sygnałowy; TB – domena transbłonowa; K – domena kinazowa; LysM – motyw LysM; LRR – motyw LRR; I – domena zewnątrzkomórkowa; II – domena wewnątrzkomórkowa.

Homologi *NFR5* znaleziono u grochu (*Pisum sativum* - gen *SYM10*) i u *M. truncatula* (gen *NFP*), a ich mutanty mają fenotypy podobne do fenotypu mutata *nfr5* z *L. japonicus* [Maden i wsp. 2003; Amor i wsp. 2003]. U *M. truncatula* zidentyfikowano także gen *LYK3*, kodujący białko typu RLK, z dwoma motywami LysM w domenie zewnątrzkomórkowej oraz mający podobną strukturę jak gen *NFR1* (Rys. 3.) [Limpens i wsp. 2003]. Wyciszenie genu *LYK3* w korzeniach techniką RNAi z zastosowaniem

transformacji *Agrobacterium rhizogenes* zatrzymywało rozwój symbiozy z *S. meliloti* na etapie tworzenia nici infekcyjnych, mimo że następowała deformacja włośników oraz indukcja podziałowa komórek kory. Efekt ten zależał od struktury czynnika Nod – wywoływany był przy zakażeniu szczepem *nodFE*, produkującym czynnik Nod o nieznacznie zmienionej strukturze (zamiana specyficznej reszty acylowej (C16:2) na resztę (C18:1)). Natomiast oddziaływanie z dzikim szczepem prowadziło do powstania nici infekcyjnych, choć wzrost części z nich był zahamowany [Limpens i wsp. 2003]. Z kolei rośliny typu dzikiego ulegały efektywnemu zakażeniu oboma szczepami *S. meliloti*. Różnice w fenotypach mutantów *lyk3* i *nfr1* sugerują, że nie mamy tu do czynienia z ortologami. Wprawdzie powodem tych różnic może być niepełne wyciszenie genu *LYK3* u *M. truncatula* bądź odmiennosc dróg transdukcji sygnału u obu roślin, jednak jest również możliwe, że *LYK3* koduje receptor niezbędny do rozpoznania czynnika Nod dopiero na etapie tworzenia nici infekcyjnych, czyli tak zwany „receptor wejściowy” (ang. *entry receptor*) [Limpens i wsp. 2003; Riely i wsp. 2004]. Istnienie co najmniej dwóch rodzajów receptorów czynnika Nod (bądź jednego receptora o różnych aktywnościach) postulowano na podstawie badań mutantów *S. meliloti nodFnodL*, produkujących czynnik Nod o nieco zmienionej strukturze (brak podstawnika acetylowego przy terminalnej reszcie glukozoaminy na końcu nieredukującym, oraz zamiana specyficznej reszty acylowej (C16:2) na resztę kwasu wakcenenowego (C18:1)). Szczep ten był zdolny do wywołania deformacji włośników korzeniowych i aktywności podziałowej komórek kory u lucerny (*M. sativa*), ale nie następowało zwijanie włośników oraz nie tworzyły się nici infekcyjne. W oparciu o te obserwacje wysunięto hipotezę o istnieniu mniej specyficznego „receptora sygnałowego”, inicjującego deformację włośników i tworzenie primordium oraz bardziej specyficznego „receptora wejściowego”, kontrolującego uwalnianie bakterii z nici infekcyjnych [Ardourel i wsp. 1994]. Istnieniem podwójnego receptora można by również wytłumaczyć fakt indukowania różnych odpowiedzi komórki odmiennymi wartościami progowymi stężenia czynnika Nod (por. punkt A.1.3.).

Interesującym spostrzeżeniem jest, że białka typu RLK, które zawierają jednocześnie motywy LysM w domenie zewnątrzkomórkowej, takie jak NFR1, NFR5 i LYK3, znaleziono dotychczas wyłącznie u roślin; ich funkcje nie są jeszcze rozpoznane. Podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowych pomiędzy produktami genów

NFR1 i *NFR5*, a niektórymi białkami RLK-LysM z *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*, jest dość wysokie, rzędu 32 – 54% [Radutoiu i wsp. 2003; Madsen i wsp. 2003].

We wczesne etapy transdukcji sygnału w symbiozie z rizobiami zaangażowany jest również produkt genu zwanego *SYMRK* lub *NORK* [Endre i wsp. 2002, Stracke i wsp. 2002]. Mutacja genu *SYMRK/NORK*, zidentyfikowanego pierwotnie u *L. japonicus* i *M. sativa*, a później także u *P. sativum* (*SYM19*) i *M. truncatula* (*DMI2*), powodowała zablokowanie odpowiedzi symbiotycznych już na etapie zmian stężenia jonów wapnia (brak oscylacji $[Ca^{2+}]$), a włośniki korzeniowe ulegały jedynie nietypowym deformacjom w postaci zgrubień i rozgałęzień. Nie dochodziło do podziałów komórek kory ani infekcji oraz nie następowała ekspresja genów wczesnych nodulin, np. *ENOD11* [Catoira i in. 2000]. Mutanty były także upośledzone pod względem zdolności do oddziaływań z grzybami symbiotycznymi - mikoryza arbuskularna była u nich zablokowana na etapie infekcji [Endre i wsp. 2002, Stracke i wsp. 2002]. *SYMRK/NORK* jest transbłonowym białkiem receptorowym z domeną kinazową, ale – w odróżnieniu od *NFR1*, *NFR5* i *LYK3* - w domenie zewnątrzkomórkowej posiada motywy typu LRR (ang. *leucine-rich repeat*; powtórzenie bogate w leucyny, Rys. 3). Obecność motywów LRR wskazuje, że domena ta jest zaangażowana w interakcje z innymi, niezidentyfikowanymi dotąd białkami.

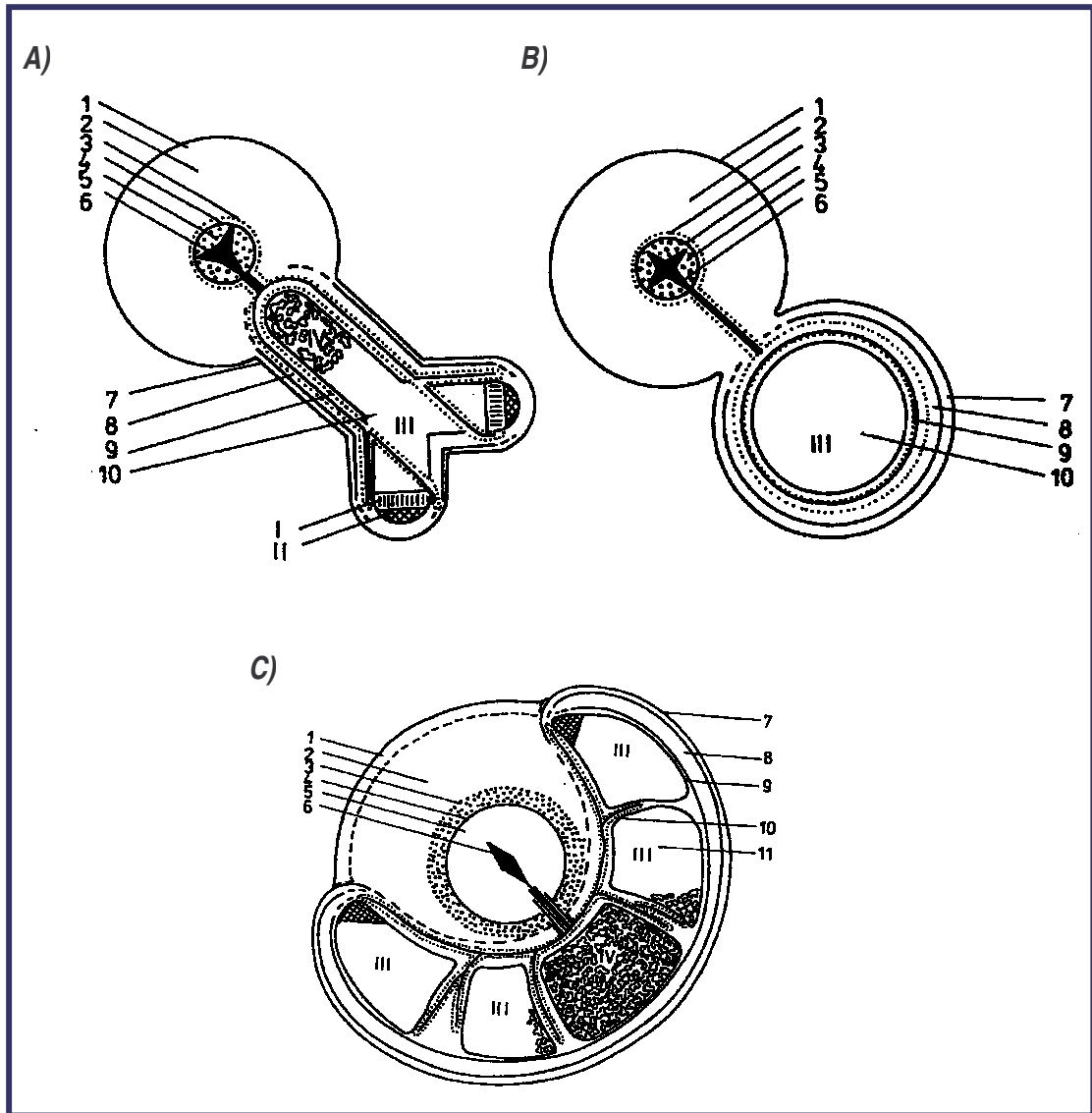
SYMRK/NORK jest pierwszym scharakteryzowanym pod względem molekularnym genem, zaangażowanym w szlak sygnalizacji wspólny dla mikoryzy i symbiotycznego wiązania azotu. Kolejne mutanty niezdolne do nawiązania obu typów interakcji z mikroorganizmami to *dmi1* i *dmi3* - mutanty *M. truncatula*. Rozwój symbiozy z rizobiami jest u nich również bardzo wczesnie hamowany (u *dmi1* już na etapie poprzedzającym oscylacje stężenia jonów wapnia, Rys. 2). Geny *DMI1* i *DMI3* kodują odpowiednio: białko będące prawdopodobnie błonowym kanałem jonowym oraz kinazę zależną od wapnia i kalmoduliny [Ane i wsp. 2004; Levy i wsp. 2004; Mitra i wsp. 2004]. W dalszym ciągu brak jednak wystarczających danych, aby powiązać ze sobą kolejne poznane do tej pory elementy szlaku sygnalizacji indukowanego obecnością czynnika Nod; nie wiadomo także, co bezpośrednio inicjuje depolaryzację błony i oscylacje stężenia jonów Ca^{2+} oraz czy wszystkie opisane odpowiedzi wywoływane są na wspólnej drodze przekazywania sygnału, czy drogi te się rozgałęziają (Rys. 2).

Kolejnym zidentyfikowanym elementem szlaku odpowiedzi na czynnik Nod jest białko kodowane przez gen *NIN* z *L. japonicus* (oraz jego homolog u *P. sativum*) [Schauser i wsp. 1999; Borisov i wsp. 2003]. U mutantów *nin*, poza występowaniem wzmożonej deformacji włośników, zablokowane były wszystkie dalsze odpowiedzi rośliny na bakterie symbiotyczne – nie rozwijały się brodawki, nie zachodziła również efektywna infekcja. Rośliny były jednak zdolne do mikoryzy arbuskularnej, nie wykazywały również innych anomalii rozwojowych. Można zatem wnioskować, że ekspresja tego genu jest wymagana na późniejszych etapach niż genów *SYMRK*, *DMI1* i *DMI3* (Rys. 2). Białko *NIN* zawiera 6 domen konserwatywnych, w tym motyw RWP-RK, który może brać udział w dimeryzacji i wiązaniu DNA oraz domenę PB1, przypuszczalnie odpowiedzialną za heterodimeryzację [Schauser i wsp. 1999]. Funkcjonuje ono najprawdopodobniej jako czynnik transkrypcyjny. Analizy podwójnych mutantów *nfr1-nin* potwierdzają, że oba geny działają na wspólnej drodze transdukcji sygnałów prowadzącej od czynnika Nod do zainicjowania podziałów komórkowych i infekcji [Radutoiu i wsp. 2003].

A.2. Morfogeneza brodawki

A.2.1. Typy brodawek

W trakcie rozwoju zawiązka brodawki powstają charakterystyczne tkanki: korowa - odgraniczająca brodawkę od środowiska zewnętrznego, bakteroidalna - zawierająca zainfekowane komórki, w których następuje wiązanie azotu oraz tkanka przewodząca, pośrednicząca w wymianie metabolitów między partnerami symbiozy. W zależności od przebiegu rozwoju i budowy dojrzałych brodawek wyróżnia się ich dwa podstawowe typy: brodawki zdeterminowane i niezdeterminowane [Sprent 1980; Hirsch 1992]. Brodawki niezdeterminowane występują u roślin strefy umiarkowanej (*Pisum*, *Medicago*, *Vicia*, *Trifolium*, *Ornithopus*) i rozwijają się poprzez odróżnicowanie komórek wewnętrznych warstw kory korzenia. Tkanka bakteroidalna dojrzałej brodawki niezdeterminowanej zachowuje aktywne centrum merystematyczne, przez co można w niej wyróżnić kilka stref o różnym stopniu odróżnicowania (Rys. 4A). Za położonym dystalnie merystemem (I) znajduje się strefa infekcji (II), w której następuje



Rysunek 4. Budowa anatomiczna brodawek (A) niezdeteminowanych; (B) zdeterminowanych (C) lupinoidalnych. A i B: 1 – epiblema, 2 – miękisz kory pierwotnej, 3 – endoderma, 4 – perycykl, 5 – floem pierwotny, 6 – ksylem pierwotny, 7 – kora brodawki, 8 – „endoderma” korowa, 9 – wiązka przewodząca, 10 – tkanka bakteroidalna. C: 1 – egzoderma, 2 – miękisz kory pierwotnej, 3 – floem wtórny, 4 – kambium, 5 – ksylem wtórny, 6 – ksylem pierwotny, 7 – tkanka okrywająca brodawki, 8 – kora zewnętrzna, 9 – kora wewnętrzna, 10 – wiązka przewodząca z endoderma, 11 – tkanka bakteroidalna. I – merystem, II – strefa infekcji, III – strefa wiązania azotu, IV – strefa starzenia. Wg: [Golinowski i Łotocka 1991]

zakażenie nowo powstałych komórek bakteriami (nici infekcyjne są obecne także w dojrzałej brodawce). Dalej występuje bogata w amyloplasty strefa przejściowa, a za nią strefa wiązania azotu (III), w której ma miejsce redukcja azotu atmosferycznego przez bakteroidy. W położonej najbardziej proksymalnie strefie starzenia (IV) następuje degradacja bakteroidów i komórek tkanki bakteroidalnej. Dzięki temu układowi brodawka przybiera charakterystyczny podłużny kształt (starsze brodawki mogą być rozgałęzione na skutek podziału centrum merystematycznego) [Golinowski i Łotocka

1991]. Natomiast brodawki zdeterminowane rozwijają się u roślin motylkowatych strefy tropikalnej (*Phaseolus*, *Glycine*, *Lotus*). Ich zawiązki powstają przez odróżnicowanie komórek zewnętrznych warstw kory, a aktywność merystematyczna utrzymuje się przez krótki czas. Dojrzałe brodawki zdeterminowane mają kształt sferyczny; ich centralną część zajmują zróżnicowane komórki tkanki bakteroidalnej, które po kilkutygodniowym okresie wiązania azotu jednocześnie zaczynają się starzeć, co prowadzi do rozpadu brodawki (Rys. 4B).

Ciekawą odmianą brodawek typu niezdeterminowanego są kołnierzykowate brodawki łubinów, które ze względu na szereg unikalnych właściwości (por. punkt A.5) bywają czasem opisywane jako oddzielny typ, zwany lupinoidalnym (Rys. 4C).

A.2.2 Rola fitohormonów

Lokalizacja miejsca inicjacji zawiązków brodawek zależna jest od endogenego rozkładu fitohormonów [Foucher i Kondorosi 2000; Oldroyd i wsp. 2001b; de Billy i wsp. 2001]. Działanie czynnika Nod (bądź innych przekaźników sygnałnych przez niego indukowanych) prawdopodobnie polega na przejściowym zaburzeniu polarnego transportu auksyn w korzeniu. Proces ten polega na aktywnym transporcie hormonu syntetyzowanego w nadziemnych częściach rośliny przez miękisz ksylemu do wierzchołkowej części korzenia, zgodnie z jego gradientem [Pacios-Bras i wsp. 2003]. Wykazano hamujący efekt czynnika Nod na polarny transport auksyn u *Trifolium repens* i *Vicia sativa* [Mathesius i wsp. 1998; Boot i wsp. 1999; Mathesius 2001]. Proponuje się, że powoduje to lokalne zwiększenie stężenia auksyn w miejscu inokulacji, co z kolei pobudza komórki kory do podziałów. Różnicą w dystrybucji auksyn w czasie pierwszych podziałów komórek primordium tłumaczy się również różnice w lokalizacji zawiązków brodawek zdeterminowanych i niezdeterminowanych – silną ekspresję białka GUS umieszczonego pod kontrolą wrażliwego na auksyny promotora GH3 obserwowano w dzielących się komórkach zewnętrznych warstw kory *L. japonicus*, natomiast u *T. repens* najwyższe stężenie auksyn zlokalizowano w warstwach wewnętrznych [Mathesius i wsp. 1998; Pacios-Bras i wsp. 2003].

W tworzenie brodawek korzeniowych zaangażowane są również cytokininy. Zewnętrzne podanie cytokinin na korzenie *Medicago* hodowanych w warunkach

niedoboru azotu wywołuje te same zmiany, co podanie czynnika Nod - pobudzenie aktywności podziałowej komórek kory, odkładanie amyloplastów w wewnętrznej warstwie kory korzenia oraz ekspresję szeregu genów kodujących wczesne noduliny, między innymi *ENOD12A*, *ENOD40* czy *ENOD2* [Dehio i de Bruijn 1992; Bauer i wsp. 1996; Fang and Hirsch 1998]. Wynika z tego, że drogi sygnalizacji indukowane przez czynnik Nod i przez cytokininy przynajmniej częściowo się zbiegają. Możliwe jest również, że to stosunek stężeń auksyn do cytokinin, a nie ich bezwzględne poziomy, warunkuje prawidłowy przebieg brodawkowania [Hirsch i Fang 1994; Mathesius i wsp. 2000a].

Inicjacja aktywności podziałowej prowadzącej do powstania primordium następuje tylko w komórkach kory leżących naprzeciwko pól protoksylemu. Taki efekt pozycyjny tłumaczy się hamującym działaniem etylenu. Inhibuje on na wczesnym etapie rozwój brodawek u *Medicago*, *Pisum*, *Vicia* i *Lotus*. Aktywność oksydazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (oksydazy ACC), będącej ostatnim enzymem na szlaku biosyntezy etylenu, wykryto w obszarach leżących naprzeciwko pól floemu u *V. sativa* [Heidstra i wsp. 1997]. Zatem w tych miejscach rozwój brodawek jest hamowany przez powstający fitohormon. Rozwój zawiązków brodawek naprzeciwko pól floemu na korzeniach poddanych działaniu inhibitorów syntezy etylenu jest tego dodatkowym potwierdzeniem [Heidstra i wsp. 1997]. Opisano także mutanta *M. truncatula*, *sickle*, u którego brodawkowanie jest niezależne od obecności etylenu, a zawiązki formują się na całym obwodzie korzenia [Penmetsa i Cook 1997]. Wpływ etylenu na rozwój brodawek jest jednak odmienny u różnych motylkowatych; jego obecność nie ma znaczenia dla prawidłowego brodawkowania u soi (*Glycine max*), jest natomiast wymagany dla utworzenia brodawek symbiotycznych u *S. rostrata* [Hunter 1993; Schmidt i wsp. 1999; D'Haese i wsp. 2003].

Fenotyp wspomnianego powyżej niewrażliwego na etylen mutanta *sickle* charakteryzuje się powstawaniem wyjątkowo licznych brodawek, dziesięciokrotnie liczniejszych niż u roślin typu dzikiego [Penmetsa i Cook 1997]. Dalsze eksperymenty pokazały, że hamujący wpływ etylenu objawia się już na bardzo wczesnych etapach odpowiedzi na czynnik Nod, a mianowicie na poziomie oscylacji stężenia jonów wapnia. Nie ustalono na razie, czy fitohormon działa bezpośrednio na tym (lub wyższym) poziomie

sygnalizacji, czy też może zaburzenie dalszych etapów transmisji sygnału oddziałuje zwrotnie na obecność i częstotliwość oscylacji [Oldroyd i wsp. 2001b].

Ograniczenie liczby brodawek pozwala zachować równowagę między korzyściami płynącymi z symbiozy, a wydatkiem energetycznym związanym z obecnością mikrosymbionta. Kolejnym ważnym elementem tej autoregulacji jest istnienie długodystansowej komunikacji pomiędzy korzeniami, a pędami roślin motylkowatych, co wykazały eksperymenty ze szczepieniem super-brodawkujących mutantów roślin typu dzikiego. Opracowany na podstawie tych badań model zakłada, że brodawkowanie stymuluje produkcję sygnału przesyłanego od korzeni do pędu; ten z kolei produkuje inhibitor, transportowany do korzenia i zwrotnie hamujący tworzenie nowych brodawek [Caetano-Anolles i Gresshoff 1991]. Ulegający ekspresji w pędach *L. japonicus* gen *HAR1* (tak jak jego ortolog *NARK* zidentyfikowany w *G. max*) koduje receptorową kinazę serynowo – treoninową, o wysokiej homologii do białka *CLAVATA1* z *A. thaliana* [Nishimura i wsp. 2002a; Krusell i wsp. 2002; Searle i wsp. 2003]. Przypuszcza się, że białko *HAR1/NARK* bierze udział w regulacji sygnału powodującego ograniczenie liczby powstających brodawek. Wydaje się również, że mechanizm działania tego sygnału jest podobny do mechanizmu represji brodawkowania w obecności związanych form azotu [Limpens i Bisseling 2003]. Jednak jego natura nie została dotąd poznana.

A.2.3 Ekspresja genów wczesnych nodulin w czasie rozwoju brodawki

Proces organogenezy brodawki znajduje się pod kontrolą genomu roślinnego. Potwierdzeniem tego jest zdolność jednego szczepu bakterii do indukowania rozwoju różnych morfologicznie i anatomicznie brodawek, w zależności od gatunku rośliny. Z kolei dany gatunek rośliny tworzy konkretny rodzaj brodawek, niezależnie od szczepu mikrosymbionta. Wyjątkiem jest tu rosnąca na podmokłych terenach tropikalna roślina *S. rostrata*, wytwarzająca brodawki łodygowe. Ma ona zdolność tworzenia brodawek obu typów, jednak czynnikiem determinującym program rozwojowy brodawek jest nie rodzaj mikrosymbionta, a obecność etylenu [Fernandez-Lopez i wsp. 1998]. Ponadto nieliczne rośliny motylkowate, np. lucerna, mają zdolność wytwarzania tzw. brodawek spontanicznych. Te niefunkcjonalne organy powstają bez udziału bakterii w warunkach deficytu azotowego [Truchet i wsp. 1989].

Mimo wieloletnich badań, wiedza na temat molekularnych podstaw tworzenia brodawek symbiotycznych wciąż nie jest pełna. Wprawdzie zidentyfikowano szereg genów wczesnych nodulin ulegających wzmożonej lub specyficznej indukcji w tworzących się brodawkach, jednak tylko dla niektórych udało się zidentyfikować funkcję w rozwoju bądź funkcjonowaniu tego organu [Mylona i wsp. 1995; Bladergroen i Spaink 1998; Jakubowska i Kowalczyk 1998; Stougaard 2000]. Do najlepiej scharakteryzowanych wczesnych nodulin należy peroksydaza *rip1*. Ekspresja genu *rip1* jest skojarzona z etapem preinfekcji – transkrypty wykryto w tych komórkach epidermalnych korzenia, które następnie zostają zainfekowane bakteriami. Maksymalny poziom ekspresji genu *rip1* obserwowany jest już około 3 hpi (godziny po inokulacji) i maleje po 48 hpi [Cook i wsp. 1995]. W sekwencji promotora *rip1* zidentyfikowano motywy OCS i OBP, które odgrywają rolę regulatorową w pewnych genach roślinnych aktywowanych pod wpływem nadtlenu wodoru; niektóre z tych genów pełnią funkcje ochronne przed śmiercią oksydacyjną bądź ingerencją patogenów [Ramu i wsp. 2002]. Tkankowa lokalizacja transkryptów *rip1* jest zbieżna z miejscem produkcji wolnych rodników, stymulowanej przez podanie czynnika Nod; podanie do korzeni nadtlenu wodoru również indukuje ekspresję tego genu [Ramu i wsp. 2002]. Brak ekspresji *rip1* oraz produkcji wolnych rodników u mutantu *dmi1*, u którego rozwój symbiozy hamowany jest na bardzo wczesnym etapie (por. punkt A.1.4), wskazuje na nowe kierunki w badaniach szlaku transdukcji sygnału w symbiozie [Ramu i wsp. 2002].

Liczną i dość dokładnie zbadaną grupę wczesnych nodulin stanowią geny kodujące prolinobogate białka, wśród nich ENOD2, ENOD10, ENOD11, ENOD12, PRP4. Ich wspólną cechą jest obecność N-końcowej sekwencji kierującej, sugerująca lokalizację produktów w ścianie komórkowej oraz występowanie bogatych w prolinę i hydroksyprolinę powtórzeń pentapeptydowych, np. PPVEK, PPVHK i PPVYK w sekwencji białka MtPRP4 z *M. truncatula* [Wilson i wsp. 1994]. Uważa się, że białka prolinobogate zaangażowane są w modyfikację matriks zewnątrzkomórkowej, co stanowi prawdopodobnie jedną z pierwszych zmian indukowanych obecnością mikrosymbionta. Ekspresję genów kodujących białka prolinobogate wykrywa się na bardzo wczesnych etapach symbiozy. Przykładowo, u *M. truncatula* aktywność genu *MtENOD11* zaobserwowano już w kilkanaście godzin po inokulacji, w różnicujących się komórkach epidermalnych zlokalizowanych w strefie młodych włosników. W

późniejszych stadiach brodawkowania oraz w dojrzałych brodawkach niezdeteminowanych, gen ten ulega ekspresji w komórkach strefy infekcji, w których obecne są nici infekcyjne [Journet i wsp. 2001]. Podobny profil ekspresji ma gen *MtENOD12*, podczas gdy aktywacja homologów *ENOD12* u innych motylkowatych (*PsENOD12A*, *VsENOD12*, *MsENOD12A*) wyprzedza pojawienie się nici infekcyjnych w tych komórkach [Pichon i wsp. 1994; Scheres i wsp. 1990a; Vijn i wsp. 1995; Bauer i wsp. 1996]. Inaczej niż pozostałe białka prolinobogate, ENOD11 i ENOD12 cechuje ogólnie niska zawartość tyrozyny i całkowity brak tego aminokwasu w sekwencjach powtórzeń bogatych w prolinę [Journet i wsp. 2001]. Uważa się, taka budowa służy zwiększeniu porowatości ściany komórkowej (tyrozyna w białkach prolinobogatych bierze udział w tworzeniu wiązań krzyżowych). Rozluźnienie struktury ściany w komórkach strefy pre- oraz infekcji ma sprzyjać tworzeniu nici infekcyjnej bądź ułatwiać penetrację bakterii.

Geny *Ps/VsENOD5*, *GmENOD55*, *MtENOD16* i *MtENOD20* kodują grupę białek również zawierających krótkie domeny bogate w (hydroksy)prolinę. Ich ekspresja ma miejsce w zainfekowanych komórkach (*ENOD5* - także w komórkach jeszcze nie zainfekowanych, ale zawierających nici infekcyjne) [Scheres i wsp. 1990b; de Blank i wsp. 1993; Greene i wsp. 1998; Fruhling i wsp. 2000]. Te wczesne noduliny wykazują duże podobieństwo do fitocyjanin, choć w przypadku białka ENOD5 brak znacznej części charakterystycznej dla fitocyjanin globularnej domeny zewnątrzkomórkowej [Greene i wsp. 1998]. Modelowanie strukturalne wykazało jednak, że najprawdopodobniej białka te nie są zaangażowane w wiązanie miedzi, z uwagi na brak kluczowych dla fitocyjanin aminokwasów, tworzących miejsce wiązania tego atomu. Mogą być natomiast zaangażowane w oddziaływania z innymi komponentami matriksu zewnątrzkomórkowej [Greene i wsp. 1998]. Funkcje poszczególnych białek prolinobogatych wciąż nie zostały jednak dokładnie określone, do czego przyczynia się fakt, że kodujące je geny prawdopodobnie uzupełniają się funkcjonalnie. Tym próbuje się tłumaczyć między innymi brak objawów fenotypowych u mutantu *M. sativa*, posiadającego niefunkcyjny allel *ENOD12* [Csanadi i wsp. 1994].

Do najwcześniejszych nodulin należy również *ENOD40*. Gen ten ulega indukcji pod wpływem czynnika Nod, a także cytokinin. Jego ekspresja w zainfekowanym korzeniu poprzedza wystąpienie pierwszych podziałów komórkowych, prowadzących do

powstania primordium [Fang i Hirsch 1998; Compaan i wsp. 2001]. W dojrzałych brodawkach transkrypty *ENOD40* obserwuje się w komórkach otaczających wiązki przewodzące brodawki [Yang i wsp. 1993]. Nadekspresja genu *ENOD40* powodowała wzmożone brodawkowanie transgenicznych *M. truncatula*, podczas gdy rośliny ze zmniejszoną ekspresją genu miały nieliczne i zmienione brodawki [Charon i wsp. 1999]. U wielu motylkowatych zidentyfikowano po dwa homologi tego genu [Matvienko i wsp. 1994; Fang i Hirsch 1998; Takeda i wsp. 2005, Podkowiński i wsp. dane niepublikowane]. Z reguły jeden z nich wykazuje brak specyficznej indukcji w symbiozie bądź też ich profile ekspresji w brodawkach są nieco odmienne. Ciekawą cechą genów *ENOD40* jest brak intronów oraz brak wspólnych długich ramek odczytu. Zidentyfikowano natomiast dwa konserwatywne rejony mRNA, w których zakodowane są bardzo krótkie ramki odczytu: 12 -13 aa w regionie 5' - końcowym (ORF I) oraz ok. 24 aa w części centralnej (ORF II) [Matvienko i wsp. 1994; Fang i Hirsch 1998; Takeda i wsp. 2005, Podkowiński i wsp. dane niepublikowane]. Zachowanie tych ramek odczytu jest niezbędne do utrzymania aktywności biologicznej *ENOD40* u lucerny [Sousa i wsp. 2001]. Niedawno wykazano aktywność translacyjną obu fragmentów genu *ENOD40* soi w ekstraktach z zarodków pszenicy [Rohrig i wsp. 2002]. Pokazano także, że powstałe peptydy wiążą się do białka syntazy sacharozy, przy czym związanie krótszego peptydu indukuje aktywność hydrolityczną, ale nie syntetazową enzymu [Rohrig i wsp. 2002, 2004]. Drugi z peptydów nie jest tak dobrze zachowany u wszystkich motylkowatych, co w zasadzie poddaje w wątpliwość jego udział w ogólnym mechanizmie działania *ENOD40*. Z kolei biochemiczne i komputerowe analizy drugorzędowej struktury mRNA dodatkowo wskazują, że *ENOD40* może działać jako ryboregulator [Sousa i wsp. 2001; Girard i wsp. 2003]. U *M. truncatula* zidentyfikowano także białko MtRBP1, należące do białek wiążących RNA, które oddziałuje z RNA *ENOD40*. Wykazano także udział RNA *ENOD40* w re-lokalizacji do cytoplazmy tego jądrowego białka [Campalans i wsp. 2004].

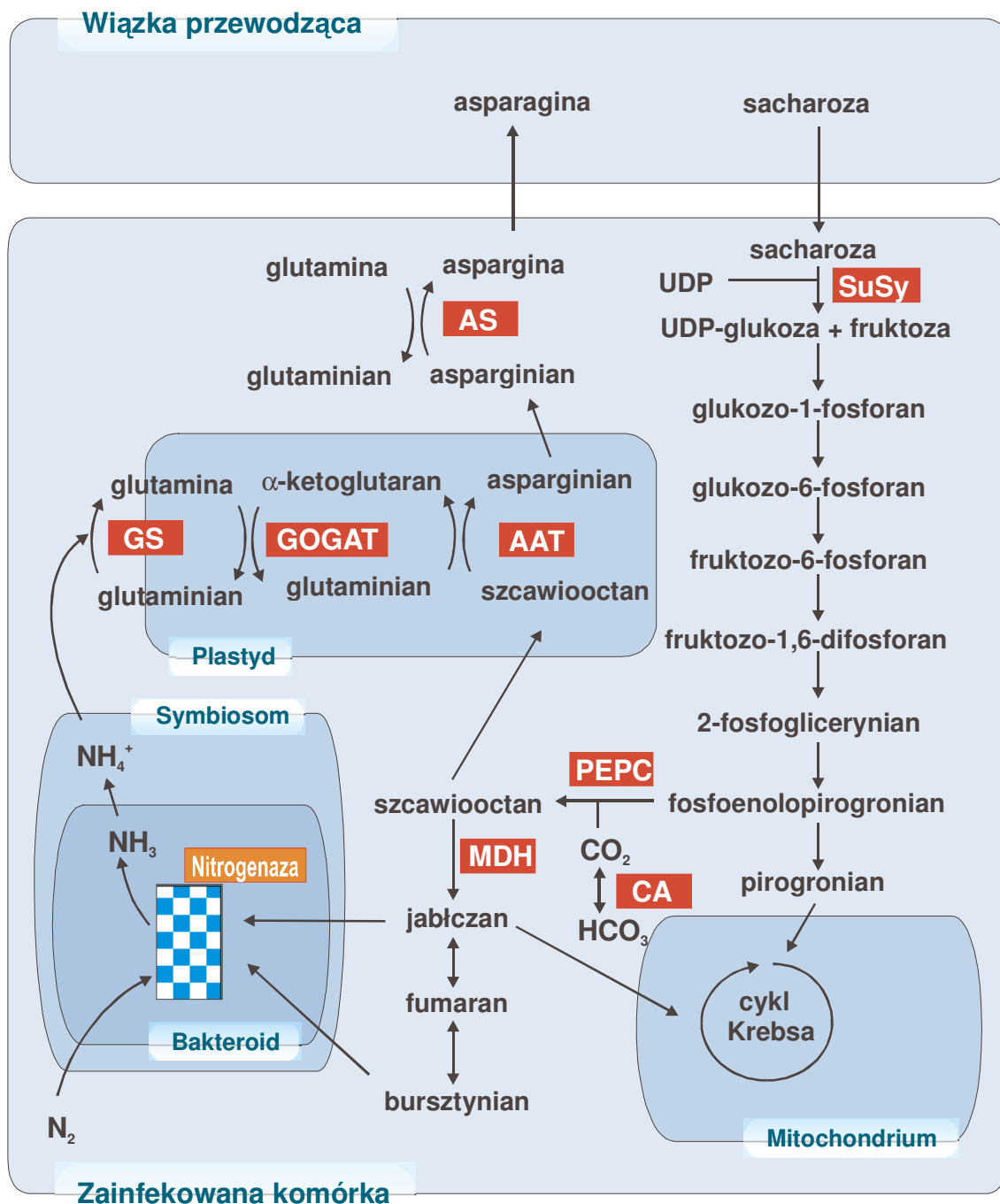
A.3. Metabolizm węgla i azotu w dojrzałej brodawce

Znacznikiem fizjologicznym decydującym tradycyjnie o zakwalifikowaniu genu do grupy wczesnych bądź późnych nodulin, jest rozpoczęcie wiązania azotu [Nap i Bisseling 1990]. W procesie tym azot cząsteczkowy (N_2) ulega wiązaniu i redukcji w

bakteroidach przy pomocy bakteryjnego enzymu – nitrogenazy. Następnie zostaje uwalniany do cytoplazmy komórki gospodarza w formie amoniaku (Rys. 5). Charakterystycznym wskaźnikiem dojrzałości funkcjonalnej brodawek jest ich różowe zabarwienie, wynikające z produkcji dużej ilości białka leghemoglobiny – może ona stanowić nawet 30% białek obecnych w zainfekowanych komórkach tkanki bakteroidalnej. Leghemoglobiny to białka zawierające hemową grupę prostetyczną. Zazwyczaj kodowane są przez rodziny genów: u *M. truncatula* zidentyfikowano ich 6, a u *L. japonicus* i *L. luteus* - po 3 [Györgyey i wp. 2000; Szczygłowski i wsp. 1997, Szybiak-Stróżycka i wsp. 1987]. Od dawna uważano, że leghemoglobiny pełnią ważną funkcję w regulacji stężenia tlenu cząsteczkowego w brodawce, wiążąc jego nadmiar i stopniowo uwalniając. W ten sposób stężenie tlenu utrzymuje się na poziomie na tyle niskim, aby nie nastąpiła dezaktywacja kompleksu nitrogenazy, a jednocześnie wystarczającym do podtrzymania procesów oddechowych bakteroidów i produkcji ATP. Tezę tę udokumentowano bezpośrednio stosunkowo niedawno, wyciszając ekspresję trzech genów symbiotycznych leghemoglobin w *L. japonicus* techniką RNAi [Ott i wsp. 2005]. Co ciekawe, okazało się, że w takich brodawkach obserwowano obniżony poziom mRNA nitrogenazy, jednocześnie nie wykrywając białka. Ponieważ stężenie wolnego tlenu w głębszych partiach brodawki w dalszym ciągu było stosunkowo niskie, może to znaczyć, że symbiotyczne leghemoglobiny pełnią także inne funkcje poza buforowaniem tlenu (zob. też podrozdział A.4). Na dodatkową rolę tych genów w symbiozie wskazują też doniesienia, że u *V. sativa* transkrypty leghemoglobiny wykryto już po 1 godzinie od podania czynnika Nod, choć gen ten uważany jest za typową późną nodulinę [Heidstra i wsp. 1997].

Uwolniony do cytoplazmy komórki roślinnej amoniak jest włączany w przemiany aminokwasów dzięki aktywności syntetazy glutaminowej (GS, EC 6.3.1.2) oraz zależnej od NADH syntazy glutaminianowej (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14). Syntetyzowane w cyklu GS/GOGAT kwas glutaminowy oraz glutamina są dalej przekształcane w kwas asparaginowy i asparaginę w reakcjach katalizowanych przez aminotransferazę kwasu asparaginowego (AAT, EC 2.6.1.1) oraz syntetazę asparaginy (AS, EC 6.3.5.4). Amidy te są jednocześnie podstawowymi transporterami azotu z brodawek typu niezdeterminowanego do pozostałych części rośliny (Rys. 5). Analizy biochemiczne i molekularne wykazały, że za metabolizm węgla i azotu w brodawkach odpowiadają głównie brodawkowo-specyficzne lub wzmocnione izoformy tych

podstawowych enzymów, kodowanych z reguły przez rodziny wielogenowe [Shi i wsp. 1997; Hohnjec i wsp. 1999; Trepp i wsp. 1999; Yoshioka i wsp. 1999]. Przykładowo, w brodawkach *M. sativa* zidentyfikowano trzy różne izoformy syntetazy glutaminowej, dwie cytozolowe i jedną plastydową, przy czym to głównie cytozolowe izoformy



Rysunek 5. Metabolizm węgla i azotu w symbiotycznej brodawce niezdeterminowanej. Pełne nazwy enzymów – w tekście

(brodawkowo wzmocniona GS13 oraz GS100) są zaangażowane w asymilację amoniaku [Temple i wsp. 1995]. Z kolei syntaza glutaminianowa zależna od NADH występuje przede wszystkim w brodawkach, a jej poziom jest niewykrywalny w tkankach zielonych, gdzie dominuje forma enzymatyczna zależna od ferredoksyny [Gregerson i wsp. 1993]. Metodą hybrydyzacji *in situ* określono lokalizację transkryptów genów metabolizmu węgla i azotu w niezdeteminowanych brodawkach *M. sativa* [Trepp i wsp. 1999]. W młodych brodawkach najsilniejsza ekspresja tych genów ma miejsce w strefie przejściowej, a w dojrzałych, 33-dniowych organach – przede wszystkim w dystalnej części strefy wiązania azotu, gdzie również wykrywany jest wysoki poziom aktywności nitrogenazy. Znaczący poziom ekspresji genów GS100 i AS wykryto również w proksymalnej części strefy III, gdzie nie zachodzi już wiązanie azotu, a tkanka bakteroidalna zaczyna przejawiać pierwsze objawy starzenia. Sugeruje to udział tych enzymów w re-mobilizacji i odzyskiwaniu związków azotowych z komórek. Jest to również zgodne z doniesieniami na temat ich aktywności w starzejących się tkankach zielonych *A. thaliana* i *Asparagus officinalis* L [Bernhard i Matile 1994; Davies i King 1993].

W brodawkach zdeterminowanych formą transportową związanego azotu są ureidy, takie jak alantoina i kwas alantoinowy. U soi kluczowe enzymy w procesie oksydacji puryn – urykaza (homotetramer polipeptydu znanego jako nodulina 35) oraz alantoinaza, ulegają ekspresji w peroksysomach niezainfekowanych komórek tkanki bakteroidalnej. Sieć tworzona przez te komórki stanowi także drogę transportu organicznych związków azotowych do tkanki przewodzącej brodawki, inaczej niż w przypadku roślin o brodawkach niezdeteminowanych, gdzie amidy są transportowane do wiązek przewodzących za pośrednictwem komórek transferowych. Co ciekawe, transkrypty genów homologicznych do urykazy/noduliny 35 zaobserwowano także w brodawkach niezdeteminowanych *M. sativa*, a wzorzec ich ekspresji był zbieżny z profilem opisanym dla brodawek zdeterminowanych. Wykrycie obecności ureidów w soku ksylemowym potwierdziło funkcjonalność tych genów w lucernie [Cheng i wsp. 2000].

Asymilacja amoniaku wymaga dostarczenia energii oraz łańcuchów węglowych niezbędnych do syntezy aminokwasów. Źródłem węgla dostarczonym do brodawek są produkty fotosyntezy, głównie sacharoza, która następnie jest metabolizowana do

szczawiooctanu przy udziale szeregu enzymów, między innymi syntazy sacharozy (SuCS, EC 2.4.1.13) oraz karboksylazy fosfoenolopirogronianu (PEPC, EC. 4.1.1.31). Z kolei szczawiooctan jest nie tylko donorem węgla w procesie asymilacji amoniaku, ale służy również do produkcji innych związków organicznych, np. jabłczanu, niezbędnego do podtrzymania metabolizmu bakteroidów (Rys. 5). Syntezę jabłczanu katalizuje dehydrogenaza jabłczanowa (MDH, EC.1.1.1.37). Brodawkowo wzmocnione izoformy tego enzymu zidentyfikowano między innymi u grochu i lucerny [Appels i Haaker 1988; Miller i wsp. 1998]. Natomiast enzym anhidraza węglanowa (AC, EC 4.2.1.1) prawdopodobnie pełni w brodawkach podwójną funkcję – uczestniczy w przemianach fosfoenolopirogronianu do szczawiooctanu w komórkach strefy wiążącej azot, ale także bierze udział w transporcie gazów mającym miejsce w części korowej brodawki [Coba de la Pena i wsp. 1997; Galvez i wsp. 2000].

A.4. Symbiotyczne wiązanie azotu a inne programy rozwojowe rośliny

Interesujący jest fakt, że ekspresję znacznej części genów uznawanych pierwotnie za brodawkowo-specyficzne, wykryto także w innych organach roślin motylkowatych (Tab. 1). Co więcej, w wielu przypadkach zidentyfikowano homologi tych genów u innych roślin, w tym jednoliściennych. Warto przy tym zauważyć, że obserwacje te spowodowały zmianę znaczenia terminu „noduliny”, stworzonego pierwotnie dla określenia genów brodawkowo – specyficznych [Legocki i Verma 1980]. Obecnie powszechnie określa się tym mianem także geny o ekspresji podwyższonej w brodawkach, ale wykrywalnej w innych organach rośliny. Doskonałym tego przykładem jest produkt genu *ENOD40*, którego funkcja nie została dotąd ostatecznie wyjaśniona (por. punkt A.2.3). Jego ekspresja jest indukowana już kilka godzin po inokulacji mikrosymbiontem [Fang i Hirsch 1998], ale wiąże się także z rozwojem korzeni bocznych, mikoryzą arbuskularną czy infekcją pasożytniczym nicieniem [Mathesius i wsp. 2000b; Staehelin i wsp. 2001; Favery i wsp. 2002]. Transkrypty *ENOD40* są wykrywane w niesymbiotycznych organach, a homologi tego genu wykryto między innymi w tytoniu, pomidorze, kukurydzy i ryżu.

Nazwa genu	Produkt	Ekspresja na wczesnych etapach symbiozy	Ekspresja w organach i roślinach niesymbiotycznych	Literatura
rip1	białko peroksydaza	od 3 h do 96 h po inokulacji w komórkach epidermy; od 3 do 7 dnia w komórkach zawiązka brodawki	wierzchołek korzenia	Cook i wsp. 1995; Ramu i wsp. 2002
ENOD11	białko zawierające powtórzenia bogate w proliny, przypuszczalnie wchodzące w skład ściany komórkowej	od 3-6 h po inokulacji w tkankach epidermalnych w strefie młodych włosników; w zawiązkach brodawek na etapie preinfekcji i infekcji	korzeń, pędy, kielkujące nasiona; aktywowany na wczesnych etapach symbiozy z grzybami mikoryzowymi w komórkach kory korzenia zawierających strzępki grzybni	journet i wsp. 2001; Kosuta i wsp. 2003
ENOD12	białko bogate w proliny	od 2-12 h po inokulacji, w zależności od gatunku rośliny; ekspresja we włosnikach i komórkach kory, w których nastąpi lub następuje infekcja, w komórkach przyszłego zawiązka brodawki	rozwój korzeni bocznych; wczesne etapy mikoryzy arbuskularnej	Scheres i wsp. 1990a, 1990b; Vijn i wsp. 1995; Bauer i wsp. 1996, 1997
ENOD5	białko bogate w proliny	w komórkach ulegających infekcji	mikoryza arbuskularna	Vijn i wsp. 1995
ENOD40	prawdopodobnie krótki peptyd i / lub ryboregulator	1-6 h po inokulacji w perycyklu korzenia oraz komórkach przyszłego zawiązku brodawki	łodyga, kwiaty; rozwój korzeni bocznych; komórki olbrzymie powstające w wyniku infekcji pasożytniczym nicieniem; na wczesnych etapach mikoryzy arbuskularnej; u szeregu motylkowatych obecny jest drugi, niesymbiotyczny gen ENOD40; homologi w ryżu, kukurydzy, tytoniu, pomidorze	Vijn i wsp. 1995; Fang i Hirsch 1998; Mathesius i wsp. 2000b; Staehelin i wsp. 2001; Favery i wsp. 2002

Tabela 1. Ekspresja niektórych genów nodulin w warunkach symbiotycznych i niesymbiotycznych

Znane są geny nodulin ulegające podwyższonej ekspresji również w kwiatach albo wykazujące homologię do genów specyficznych dla tkanek kwiatu [Szczygłowski i Amyot 2003]. Wykryto szereg analogii pomiędzy wydłużaniem nici infekcyjnych w symbiozie, a wierzchołkowym wzrostem łagiewki pyłkowej. Symbiotyczne mutanty *L. japonicus*, *crinkle*, wykazują zaburzenia na wczesnym etapie rozwoju nici infekcyjnych, ale także nieprawidłowy rozwój pyłku i łagiewki pyłkowej [Tansengco i wsp. 2003, 2004]. Wskazuje się na możliwe podobieństwo mechanizmów regulacji i sygnalizacji tych procesów [Szczygłowski i Amyot 2003]. Wyniki badań Rodriguez-Llorente i wsp. [2004] prowadzonych na dwóch gatunkach *Medicago* sugerują, że w rozwój nici infekcyjnych zaangażowana jest maszyna modyfikacji pektyn i degradacji ścian komórkowych, niezbędna także do prawidłowego kiełkowania łagiewki pyłkowej. Według Autorów, geny symbiotycznych poligalakturonaz *MtPG3* i *MsPG3* oraz gen symbiotycznej metylesterazy pektynianowej *MtPER* mogły powstać przez duplikację ich niesymbiotycznych homologów, specyficznych dla pyłku (o czym świadczy m. in. wysoki stopień identyczności na poziomie aminokwasowym, podobna organizacja genów homologicznych, obecność w promotorach genów symbiotycznych motywu regulatorowego specyficznego dla genów ulegających ekspresji w pyłku oraz umiejscowienie genu *MtPER* wraz z niesymbiotycznymi *MtPEF1* i *MTPEF2* we wspólnym lokus w genomie *M. truncatula*).

Szczególnie wyraźne są podobieństwa między symbiotycznym wiązaniem azotu i ewolucyjnie starszą formą symbiozy - mikoryzą arbuskularną, do której zdolność posiada ponad 80% gatunków roślin. Zarówno dane na temat aktywności szeregu genów, jak i analizy mutantów (por. punkt A.1.4.) wskazują na obecność wspólnych etapów w rozwoju obu rodzajów symbiozy. Podobieństwa sięgają także systemów autoregulacji liczby efektywnych infekcji mikrosymbiontem; super-brodawkujące mutanty soi mają jednocześnie upośledzone mechanizmy supresji kolonizacji korzenia przez grzyby mikoryzowe [Meixner i wsp. 2005]. Stąd hipotezę, że w trakcie ewolucji symbiozy z rizobiami zaadaptowane zostały istniejące już szlaki i mechanizmy aktywne w mikoryzie, uznaje się za bardzo wiarygodną [Albrecht i wsp. 1999; Kistner i Parniske 2002; Brewin 2002; Szczygłowski i Amyot 2003].

Wśród genów nodulinowych, które ulegają indukcji w trakcie mikoryzy arbuskularnej, jest też leghemoglobina [Vieweg i wsp. 2004]. Po raz kolejny wskazuje to na nowe

aspekty działania tej pozornie najlepiej poznanej noduliny. Ponadto liczne rośliny, nie tylko motylkowate, posiadają geny niesymbiotycznych hemoglobin, o niezidentyfikowanej funkcji [Arredondo-Peter i wsp. 1998]. Część z nich (tzw. klasa 1), z uwagi na zbyt duże powinowactwo do tlenu, nie bierze najprawdopodobniej udziału w jego buforowaniu. Zaproponowano, że odgrywają one rolę w szlaku odpowiedzi na niedotlenienie, w którym indukowana jest produkcja tlenku azotu i wolnych rodników [Dordas i wsp. 2003a, 2003b, 2004]. Nie wiadomo na razie, czy symbiotyczne leghemoglobiny pełnią dodatkowo podobną rolę regulatorową w brodawkach korzeniowych.

Odkrywane podobieństwa pomiędzy symbiotycznym wiązaniem azotu, a innymi formami interakcji roślin z mikroorganizmami, reakcjami obronnymi komórki i procesami rozwojowymi pokazują, że podczas ewolucji symbiotycznego wiązania azotu zostały wykorzystane i zmodyfikowane już istniejące mechanizmy, powszechne w świecie roślin [Hirsch i wsp. 2001]. W świetle tych faktów unikalność symbiozy z rizobiami wydaje się jeszcze bardziej intrygująca.

A.5. Symbiotyczne wiązanie azotu w łubinie

Układ symbiotyczny łubiny – bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* cechuje szereg unikalnych właściwości, takich jak nietypowa budowa brodawek (Rys. 4C.) [Pueppke i Broughton 1999]. Ich charakterystyczny kołnierzykowaty kształt jest wynikiem wczesnego podziału merystemu brodawki na merystemy boczne. Aktywność tych merystemów powoduje obrastanie korzenia przez rosnącą brodawkę. Organogeneza brodawek łubinów rozpoczyna się przez odróżnicowanie zewnętrznych warstw kory korzenia, co jest cechą charakterystyczną brodawek zdeterminowanych [Golinowski i Łotocka 1991; Łotocka i Golinowski 1995]. Również przebieg infekcji jest u łubinu odmienny – bakterie wnikają do włośnika poprzez pęknięcia i przerwy w ścianie komórkowej, a następnie, na zasadzie endocytozy, do komórek zawiązka brodawki [Tang i wsp. 1993, Łotocka i wsp. 2000]. Nie występuje tu strefa infekcji i nie tworzą się nici infekcyjne; zakażenie komórek ma miejsce jeszcze przed ustaniem ich aktywności podziałowej, a w dojrzałych brodawkach nie ma charakterystycznego dla brodawek niezdzeterminowanych podziału na strefy oraz nie tworzy się zewnętrzna

warstwa korowa, tzw. endoderma [Łotocka i wsp. 2000]. Interesujące jest również to, że rośliny z rodzaju *Lupinus*, są jedynymi znanymi motylkowatymi nie posiadającymi zdolności do symbiozy z grzybami mikoryzowymi, choć u niektórych gatunków zaobserwowano pewien wzrost strzępek zewnętrznych lub wewnętrznych grzyba [Oba i wsp. 2001].

Dotychczasowe badania symbiotycznego wiązania azotu w łubinie skupiały się przede wszystkim na funkcjonowaniu dojrzałej brodawki. W łubinie żółtym scharakteryzowano pod względem ekspresji w brodawkach, a czasem też funkcji w symbiozie szereg genów, między innymi leghemoglobiny [Szybiak-Stróżycka i wsp. 1987], ferrytyny [Stróżycki i wsp. 2003], brodawkowo-specyficzną syntetazę glutaminianową [Boroń i wsp. 1989], brodawkowo-specyficzną aminotransferazę asparaginy [Golińska i wsp. 1989] czy nodulinę-45 [Szczygłowski i wsp. 1989]. Niewiele natomiast wiadomo o molekularnym podłożu wczesnych etapów symbiozy w łubinie. Poszerzenie wiedzy o szlakach sygnalizacji i najwcześniejszych stadiach rozwoju brodawek lupinoidalnych może być oryginalnym uzupełnieniem informacji o mechanizmach funkcjonujących podczas zawiązywania symbiozy.

A.6. Metody analizowania ekspresji genów na poziomie transkrypcji w badaniach rozwoju i funkcjonowania brodawek symbiotycznych

Podstawowym sposobem odpowiedzi organizmów na sygnały wewnętrzne i zewnętrzne jest modulacja ekspresji genów. Dlatego śledzenie zmian w ekspresji genów jest użytecznym narzędziem służącym odkrywaniu molekularnych podstaw procesów biologicznych. Mimo, że końcowymi produktami ekspresji większości poznanych genów są białka, szeroko stosowana jest analiza ekspresji genów na poziomie transkryptów - jest to dużo prostsze i mniej kosztowne niż pomiar stężenia białek. Dodatkowo pozwala to na uzyskanie szeregu istotnych informacji na temat badanych procesów, np. przypuszczalnych funkcji genów – zwłaszcza w połączeniu z analizą sekwencji transkryptów. Dzięki szybkiemu rozwojowi technologii i informatyki oraz wynikającemu z tego postępowi w technikach sekwencjonowania DNA, w ostatnich dwóch dziesięcioleciach dokonał się prawdziwy przełom w tej dziedzinie. Obok tradycyjnych metod umożliwiających analizę ekspresji pojedynczych genów, takich jak

hybrydyzacja northern, hybrydyzacja kropkowa (ang. *dot blot*) czy test ochrony przed nukleazą (ang. *nuclease protection assay*), pojawiły się techniki pozwalające na analizę porównawczą nawet całego transkryptomu. Są one oparte o komputerową analizę sekwencji (np. elektroniczny northern sekwencji EST lub SAGE), analizę fragmentów (np. amplifikacja różnicowa) bądź hybrydyzację (np. hybrydyzacja różnicowa, hybrydyzacja subtrakcyjna, makro- i mikromacierze DNA).

Zasadniczym celem takich masowych analiz jest próba identyfikacji puli genów, podlegających pozytywnej bądź negatywnej regulacji. To z kolei stanowi wskazówkę do odkrycia kluczowych dla badanego procesu szlaków i zależności. Ponieważ wzorce ekspresji wielu genów w trakcie rozwoju i funkcjonowania brodawek są dramatycznie różne od profili ekspresji w korzeniu, co opisano w poprzednich podrozdziałach, analizy różnicowe są z dużym powodzeniem wykorzystywane do identyfikacji nowych genów nodulin w roślinach motylkowatych. Poniżej przedstawiono pokrótce te metody, które przyczyniły się do znaczącego wzrostu wiedzy na temat molekularnych podstaw brodawkowania.

A.6.1. Hybrydyzacja subtrakcyjna

Hybrydyzacja subtrakcyjna jest odmianą hybrydyzacji różnicowej, która polega na przeszukaniu puli sond cDNA dwiema próbami pochodzącymi z tkanki badanej i kontrolnej, a następnie porównywaniu intensywności sygnałów otrzymanych dla każdej z sond. Geny, dla których wykazane zostaną istotne różnice w intensywności sygnałów, są typowane na ulegające regulacji w badanym procesie. Hybrydyzacja różnicowa jest dość skuteczną metodą w przypadku genów ulegających silnej ekspresji, jednak dla genów wyrażanych na niskim poziomie jej czułość jest niewystarczająca. Subtrakcja pozwala na zwiększenie czułości przeszukiwania przez wzbogacenie próby w transkrypty ulegające różnicowej ekspresji, na etapie poprzedzającym znakowanie [Sargent i Dawid 1983; Wang i Brown 1991]. Efekt ten uzyskuje się przez wstępną hybrydyzację jednoniciowego cDNA, otrzymanego na matrycy mRNA z tkanki badanej, do mRNA pochodzącego z tkanki kontrolnej. Frakcja cDNA, dla której w puli kontrolnego mRNA nie ma komplementarnych transkryptów, nie tworzy dupleksów i jest następnie oddzielana od hybryd cDNA-RNA, np. na kolumnie hydroksypatytowej. Po hybrydyzacji biblioteki cDNA z tak przygotowaną próbą otrzymuje się sygnał

wyłącznie od klonów reprezentujących geny ulegające znacząco podwyższonej ekspresji w badanej tkance w porównaniu z tkanką kontrolną. Minusem tej metody jest konieczność zastosowania dużych ilości wyjściowego materiału, a także jednokierunkowość badanych zmian – w procesie subtrakcji próba wzbogacana jest tylko w cDNA specyficzne dla jednego z porównywanych procesów. Poszukiwanie genów ulegających negatywnej regulacji wymaga zatem odrębnej, odwrotnej subtrakcji. Dodatkowo, kilkietapowy proces subtrakcji i oczyszczania próby stwarza ryzyko utraty tych cDNA, które występują w niewielkiej ilości kopii. Niemniej hybrydyzacja subtrakcyjna okazała się cennym narzędziem w badaniu symbiotycznego wiązania azotu, między innymi u *G. max*, *V. faba* i *M. truncatula* [Kouchi i Hata 1993; Purlick i Puhler 1993; Cook i wsp. 1995]. W ten sposób na przykład zidentyfikowano w bobie szereg homologów wcześniej poznanych genów nodulin (*PsENOD2*, *PsENOD3*, *PsENOD5*, *PsENOD12*, *MsNOD25*, leghemoglobiny), oraz brodawkowo specyficzne homologi syntazy sacharozy i syntetazy asparaginy. [Purlick i Puhler 1993]. Przede wszystkim jednak hybrydyzacja subtrakcyjna pozwoliła na wyizolowanie szeregu nowych genów nodulin, ulegających ekspresji na wczesnych etapach brodawkowania, kiedy zawiązki brodawek nie są jeszcze widoczne. Przykładem może tu być zidentyfikowanie nowej noduliny w subtrakcyjnej bibliotece z korzeni *M. truncatula*, wzbogaconej w cDNA specyficzne dla wczesnych stadiów brodawkowania (48 i 108 hpi) [Cook i wsp. 1995]. Odkryty gen, nazwany *rip1*, koduje białko peroksydazę i ulega przejściowej ekspresji na etapie preinfekcji (por. punkt A.2.3). W innym eksperymencie, również u *M. truncatula*, zidentyfikowano 29 nowych genów nodulin, między innymi *MtN13* i *MtN6* (kodujące białka homologiczne do genów odpowiedzi obronnej) oraz *MtN1* (ulegający ekspresji na etapie preinfekcji w primordiach i w strefie infekcji dojrzałych brodawek) [Gamas i wsp. 1996, 1998; Mathis i wsp. 1999].

A.6.2. Wyszukiwanie zimnych łysinek

Innym sposobem identyfikacji genów na podstawie ekspresji różnicowej jest poszukiwanie zimnych łysinek (ang. *cold plaque screening*). Metoda ta, opisana na początku lat dziewięćdziesiątych, jest alternatywnym do hybrydyzacji subtrakcyjnej podejściem, pozwalającym na identyfikację transkryptów o niskiej ekspresji [Hodge i wsp. 1992]. Bazuje ona na wstępnej selekcji takich klonów (reprezentowanych przez łysinki fagowe), dla których nie można wykryć sygnału po hybrydyzacji z sondą

pochodzącą z tego samego materiału, co przeszukiwana biblioteka. Wyselekcjonowane z takich „zimnych” łysinek klony poddaje się amplifikacji PCR, a następnie prowadzi się ich dalszą analizę, np. przy pomocy hybrydyzacji northern. Metodę poszukiwania zimnych łysinek, samą bądź w kombinacji z hybrydyzacją różnicową, zastosowano do identyfikacji genów *M. sativa*, regulowanych w trakcie symbiozy z *S. meliloti*, co zaowocowało identyfikacją szeregu genów nodulin [Frugier i wsp. 1998, 2000; Jimenez-Zurdo i wsp. 2000]. Sekwencje produktów kodowanych przez niektóre z nich (np. białka zawierające motyw palca cynkowego, białka z domeną kinazową czy homologu supresora nerzaka zarodkowego) sugerują, że geny te mogą odgrywać rolę regulatorową w szlakach sygnalizacji indukowanych w czasie symbiozy.

A.6.3. Amplifikacja różnicowa

Metoda amplifikacji różnicowej (ang. *differential display*) została opisana na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [Liang i Pardee 1992]. Polega ona na równoległej amplifikacji RT PCR transkryptów pochodzących z tkanki badanej i kontrolnej. Na etapie odwrotnej transkrypcji stosuje się cztery pule zmodyfikowanych starterów oligo(dT), różniących się końcami 3', a do amplifikacji używa się tych samych starterów oraz arbitralnie zaprojektowanych starterów 10-nukleotydowych. Wyznakowane radioaktywnie w czasie PCR produkty amplifikacji są rozdzielane w żelu poliakrylamidowym, a organospecyficzne produkty są identyfikowane poprzez porównywanie wzorów prążków na żelach dla obu badanych tkanek. Amplifikacja różnicowa zyskała uznanie przede wszystkim z uwagi na niewielką ilość wyjściowego materiału potrzebnego do amplifikacji oraz fakt, że czułość metody nie jest zależna od poziomu ekspresji genu. Oznacza to możliwość identyfikacji także tych genów, które ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie. Jednak wiąże się ona również z trudnościami polegającymi na dużej ilości fałszywie pozytywnych wyników (artefaktów) oraz kłopotach w sekwencjonowaniu i identyfikacji wyciętych z żelu, często zanieczyszczonych, fragmentów [Lievens i wsp. 2001]. Dodatkowo, podobnie jak hybrydyzacja subtrakcyjna i wyszukiwanie zimnych łysinek, nie jest to metoda ilościowa.

Amplifikację różnicową stosowano kilkakrotnie do identyfikacji genów specyficznych brodawkowo u *S. rostrata*, *L. japonicus* i *M. truncatula* [Goormachtig i wsp. 1995;

Szczygłowski i wsp. 1997; Nieble i wsp. 1998]. Także w Pracowni Biologii Molekularnej Roślin IChB PAN w Poznaniu użyto tej metody do poszukiwania specyficznych-brodawkowo genów z *L. luteus* [Świdorski i wsp. 2000]. Zaowocowało to identyfikacją 12 takich produktów, z czego dla czterech określono kompletną lub częściową sekwencję cDNA oraz profil ekspresji w trakcie brodawkowania. Trzy z nich to późne noduliny, których funkcji nie zidentyfikowano. Czwarty – gen desaturazy stearoilo-ACP – ulega ekspresji od 9 dpi (dni po inokulacji) i może być zaangażowany w tworzenie błon retikulum endoplazmatycznego oraz błony peribakteroidalnej [Zaborowska i wsp. 2002].

A.6.4. Sekwencje EST i elektroniczny northern

Sekwencje EST (ang. EST - *expressed sequence tag*), czyli etykiety ekspresyjne to kilkusetnukleotydowe fragmenty sekwencji cDNA uzyskane przez jednokrotne sekwencjonowanie ich końców. Dzięki łatwości otrzymywania, tworzenie bibliotek EST stało się alternatywą dla projektów sekwencjonowania genomów, w szczególności dużych i często poliploidalnych genomów roślinnych. Oparte o komputerową analizę badanie częstości występowania sekwencji EST uzyskanych z bibliotek pochodzących z różnych organów czy tkanek, zwane elektronicznym northernem, okazało się skutecznym podejściem do analizy ekspresji genów *in silico*. W analizach wykorzystuje się sekwencje pochodzących z nie znormalizowanych i nie poddanych subtrakcji bibliotek, a trafność takich przewidywań zwiększa się oczywiście wraz ze wzrostem ilości danych, a zatem zależy od poziomu ekspresji genu oraz liczby wygenerowanych sekwencji EST dla danej biblioteki [Rafalski i wsp. 1998]. Stąd, w przypadku roślin motylkowatych, elektroniczny northern może mieć obecnie największe zastosowanie w badaniu *G. max*, *M. truncatula* oraz *L. japonicus* [Ramirez i wsp. 2005; Journet i wsp. 2002; Fedorova i wsp. 2002], dla których w bazach sekwencji Gene Indices (TIGR) i GenBank (NIH) notuje się obecnie największą ilość sekwencji z różnorodnych bibliotek cDNA.

Potencjał tej metody obrazuje bardzo dobrze analiza przeprowadzona przez Fedorovą i wsp. [2002], na około 141 000 sekwencji z *M. truncatula*, zdeponowanych w bazie MtGI (obecnie jest ich już ponad 226 000). Stosując operatory logiczne, Autorzy wyekstrahowali z tej puli 340 sekwencji EST występujących wyłącznie w bibliotekach

pochodzących z brodawek symbiotycznych w różnych stadiach rozwoju, w co najmniej dwóch powtórzeniach. Część z nich opisano po raz pierwszy, między innymi 6 kontigów złożonych z 3-14 fragmentów kodujących produkty białkowe o wysokiej homologii do kalmodulin. Analiza ich sekwencji aminokwasowych wykazała jednak obecność niespotykanego u tego typu białek peptydu sygnałowego na końcu N oraz mniejszej liczby kompletnych domen wiążących jony Ca^{2+} , co sugeruje ich inną lokalizację komórkową i wyspecjalizowaną funkcję. Weryfikacja profilu ekspresji 91 genów przy pomocy makromacierzy DNA i hybrydyzacji kropkowej potwierdziła skuteczność selekcji dla genów reprezentowanych przez co najmniej 6 sekwencji EST, podczas gdy dla mniej licznych grup wyniki nie zawsze były zgodne. Potwierdza to zasadność wyboru jak największych bibliotek EST do tego typu analiz.

A.6.5. Makro- i mikromacierze DNA

Równoległe z generowaniem bibliotek EST bardzo często prowadzone są badania ekspresji z zastosowaniem macierzy DNA, czyli uporządkowanego zestawu sond reprezentujących analizowane klony, unieruchomionych na stałym nośniku. Macierz jest poddawana hybrydyzacji z komplementarnymi cząsteczkami DNA (cDNA) lub RNA (cRNA), zawartymi w próbce otrzymanej na matrycy transkryptów wyizolowanych z wybranego organu bądź tkanki. W przypadku radioaktywnie znakowanych prób, najpowszechniej dotąd stosowanych, sondy DNA (plazmidy z insertami cDNA lub produkty amplifikacji PCR) umieszczane są na błonach nylonowych lub nitrocelulozowych. Przygotowanie takich macierzy DNA jest możliwe nawet przy użyciu standardowego wyposażenia laboratoryjnego (pipeta lub replikator dopasowany do płytek mikrostudzienkowych), co sprawia, że jest to technika łatwa do wdrożenia. Jednak z uwagi na duże rozmiary otrzymywanych macierzy (wynikające ze sposobu nanoszenia sond, właściwości podłoża oraz konieczność zachowania odległości pomiędzy sondami, co ma zapobiec nakładaniu się sygnałów), podejście to stosuje się do analiz kilkuset, maksymalnie kilku tysięcy genów jednocześnie - są to makromacierze DNA. Miniaturyzację procesu umożliwiło zastosowanie nowoczesnych technologii – od około dziesięciu lat rozwija się metoda analizy ekspresji przy użyciu mikromacierzy DNA [Sчена i wsp. 2005], gdzie sondy w postaci produktów amplifikacji PCR lub krótkich syntetycznych oligonukleotydów, nanoszone są z dużą gęstością na szklane podłoże pokryte odpowiednim nośnikiem (polilizyna, aminosilany,

aldehydy i inne). Gęste upakowanie (do kilkudziesięciu tysięcy sond na mikromacierzy) oraz fluorescencyjne znakowanie próby pozwala na przeprowadzenie reakcji hybrydyzacji w objętości nawet kilkudziesięciu mikrolitrów buforu hybrydyzacyjnego, a detekcja laserowa z zastosowaniem systemów wzmacniania sygnału zapewnia wysoką czułość reakcji. Co więcej, w przypadku mikromacierzy cDNA, zastosowanie odpowiednio dobranej pary fluoroforów (np. Cy3 i Cy5) i długości fal wzbudzenia laserem, pozwala na hybrydyzowanie jednocześnie dwóch prób do pojedynczej mikromacierzy. Takie postępowanie znacząco podnosi jakość analiz różnicowych, bo wyklucza różnice w intensywności sygnałów powodowane naniesieniem odmiennych ilości sondy bądź zmianą warunków hybrydyzacji. Wprawdzie obróbka i analiza olbrzymiej ilości danych uzyskanych przy pomocy mikromacierzy cDNA wymaga zastosowania specjalnego oprogramowania, ale ma to również taką zaletę, że dostępne są aplikacje pozwalające na integrowanie wyników z szeregu eksperymentów i grupowanie genów pod kątem zbliżonych profili ekspresji oraz - co za tym często idzie - podobnych funkcji [Eisen i wsp. 1998; Brazma i wsp. 2001; Quackenbush 2001].

Technika macierzy DNA jest coraz powszechniej wykorzystywana do analizy brodawkowania i symbiotycznego wiązania azotu u motylkowatych. Tylko w 2004 roku opublikowano pokaźną ilość prac opartych o te techniki, przy czym większość dotyczy roślin modelowych, dla których projekty sekwencjonowania genomu są daleko zaawansowane oraz dostępna jest duża liczba sekwencji EST [Kuster i wsp. 2004; Lee i wsp. 2004; Manthey i wsp. 2004; El Yahyaoui i wsp. 2004; Suganuma i wsp. 2004; Barnett i wsp. 2004; Kouchi i wsp. 2004; Colebatch i wsp. 2004]. W przypadku *M. truncatula* szerokie zastosowanie znajdują bliźniacze makro- i mikromacierz Mt6k-RIT, zawierające po 5 648 sond cDNA, reprezentujących geny ulegające ekspresji w korzeniach nieinfekowanych oraz w różnych rodzajach symbiozy. Macierze te nadają także do badań porównawczych symbiotycznego wiązania azotu i mikoryzy arbuskularnej [Kuster i wsp. 2004]. Ich użycie zaowocowało wstępną identyfikacją kilkuset genów o ekspresji zmienionej w trakcie symbiozy z *S. meliloti* oraz kilkudziesięciu genów, które mogą być ważne w obu rodzajach interakcji symbiotycznych. Wśród nich znalazło się szereg genów o potencjalnych funkcjach regulatorowych [Manthey i wsp. 2004; Yahyaoui i wsp. 2004]. Również dla *L. japonicus* profilowanie ekspresji przy użyciu macierzy cDNA przyniosło identyfikację dużej ilości genów ulegających podwyższonej ekspresji w czasie infekcji

rizobiami bądź specyficznych dla tego etapu. Wśród nich znalazło się wiele nowych potencjalnych nodulin, reprezentujących tak różne procesy komórkowe jak: transport błonowy, reakcje obronne, synteza i odpowiedź na fitohormony, sygnalizacja, synteza ścian komórkowych czy regulacja transkrypcji [Kouchi i wsp. 2004; Colebatch i wsp. 2004]. Macierze DNA wykorzystuje się również do analiz transkryptomów symbiotycznych mutantów, w celu identyfikacji szlaków transdukcji sygnału i mechanizmów regulacji brodawkowania [Suganuma i wsp. 2004; El Yahyaoui i wsp. 2004]. Warto także wspomnieć o pionierskiej pracy Barnett i wsp. [2004], gdzie wykorzystano wspólną mikromacierz oligonukleotydową do jednoczesnej analizy transkryptomów obu partnerów symbiozy, w układzie *M. truncatula* – *S. meliloti*.

B. CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

Niniejsza rozprawa poświęcona jest charakterystyce oddziaływań symbiotycznych łubinu wąskolistnego z bakteriami *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistareum WM9. Celem pracy była identyfikacja genów roślinnych zaangażowanych w ustanowienie tych oddziaływań oraz w rozwój i funkcjonowanie brodawek korzeniowych, oraz charakterystyka czasowych zmian ekspresji tych genów w symbiozie.

Na szczegółowe założenia pracy składają się:

- selekcja genów o ekspresji modulowanej w symbiozie poprzez analizę różnicową cDNA ze znormalizowanej biblioteki z korzeni łubinu wąskolistnego infekowanych mikrosymbiontem;
- otrzymanie zestawu cDNA markerowych reprezentujących geny związane z tworzeniem i funkcjonowaniem brodawek, sygnalizacją w symbiozie oraz geny odpowiedzi na czynniki stresowe poprzez i) losowy wybór klonów cDNA z ww. biblioteki oraz ii) amplifikację RT PCR, w oparciu o dane sekwencyjne genów z innych roślin;
- częściowe określenie sekwencji nukleotydowych otrzymanych klonów cDNA i ich analiza komputerowa;
- konstrukcja makromacierzy cDNA i analiza zmian ekspresji otrzymanych genów w symbiozie;
- weryfikacja uzyskanych profili ekspresji poprzez analizę northern kilku klonów cDNA;
- próba określenia całkowitej sekwencji cDNA wybranych genów.

W 2003 roku opublikowano doniesienia o identyfikacji prawdopodobnych receptorów bakteryjnego czynnika Nod. Poznanie procesu ewolucji kodujących je genów oraz sposobu i specyfiki oddziaływań receptorów z cząsteczkami czynnika Nod może okazać się pomocne w zrozumieniu, dlaczego zdolność do symbiozy z rizobiami wykształciła się u tak wąskiej grupy roślin nasiennych. Stąd jako dodatkowe zadanie przyjęto konstrukcję drzewa filogenetycznego genu receptora *NFR5* obejmującą różne gatunki rodzaju *Lupinus* oraz pokrewnych gatunków i porównanie go z drzewami uzyskiwanymi dla genów nie związanych z symbiotycznym wiązaniem azotu.

C. MATERIAŁY I METODY

C.1. Wykaz stosowanych materiałów i odczynników

C.1.1. Materiał biologiczny

C.1.1.1. Rośliny

Nasiona pochodziły z następujących źródeł:

HR Smolice O/Przebędowo

L. angustifolius, var. EMIR

SHR Wiatrowo

L. luteus, var. VENTUS

INIAP, Ekwador - dzięki uprzejmości Gustavo Bernal'a

L. mutabilis

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazylia – dzięki uprzejmości

Marii Teresy Schifino Wittmann

L. quadraticus

University of Oxford, Wielka Brytania – dzięki uprzejmości Colina Hughes'a

L. sp CEH 2001

United States Department of Agriculture, USA – dzięki uprzejmości Clarence

Coyne

pozostałe gatunki

C.1.1.2. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli SOLR[®] – e14–(McrA–) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC
recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λR [F' proAB
lacIqZΔM15] Su– (Stratagene)

szczep użyty do przygotowania znormalizowanej biblioteki cDNA 115/2

Escherichia coli INVαF' - F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1
gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 λ- (Invitrogen)

Bradyrhizobium japonicum bv. *genistaerum* WM9 – szczep wyizolowany z brodawek łubinu żółtego zebranego na terenie Roztocza, otrzymano od prof. W. Małek (UMCS, Lublin)

C.1.1.3. Wektory plazmidowe

pBluescript SK (+/-) - pochodna pUC19, wektor użyty do przygotowania znormalizowanej biblioteki cDNA 115/2. Zawiera: ColE1 ori, f1 ori, promotory polimeraz T3 i T7, promotor *lac* z fragmentem sekwencji kodującej *lacZ*, umożliwiającą przeprowadzenie testu α -komplementacji w celu selekcji rekombinantów, gen oporności na ampicylinę, miejsce wielokrotnego klonowania

pCR[®]2.1 – zawiera pUC ori, f1 ori, promotor polimerazy T7, promotor *lac* z fragmentem *lacZa*, kodującym 146 aa β -galaktozydazy, umożliwiającą przeprowadzenie testu α -komplementacji w celu selekcji rekombinantów, geny oporności na ampicylinę i kanamycynę, miejsce wielokrotnego klonowania (Invitrogen)

pGEM[®]-T i pGEM[®]-T Easy – zawierają f1 ori, promotory polimeraz T7 i SP6, miejsce wielokrotnego klonowania, gen oporności na ampicylinę, operon *lacZ*, umożliwiającą przeprowadzenie testu α -komplementacji w celu selekcji rekombinantów

C.1.1.4. AFGC Microarray Control Set

Zestaw kontrolny składający się z 18 plazmidów zawierających fragmenty genów nie pochodzących z roślin uzyskano z The Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

W pracy wykorzystywano 11 plazmidów z zestawu AFGC Microarray Control Set (Tab. 2).

Klon	ID	Numer dostępu	Wycinek zdeponowanej sekwencji	Wektor	Poli(A)
BT	<i>B. thuringiensis cry1Ac</i>	U89872	415-2225 nt	pBluescript II SK	x
GFP	Green Fluorescent Protein	AF078810	1603-2319 nt	pGEM-T	x
Globin	Globin	NM_000518	50-523 nt	pBluescript II SK	x
GUS	beta-glucuronidase (uidA)	A00196	284-2151 nt	pBluescript II SK	x
HPH	hygromycin B phosphotransferase	K01193	199-1251 nt	pBluescript II SK	x
Luc	Luciferase	X65316	102-1754 nt	pBluescript II SK	x
BAR	Phosphinothricin acetyl transferase	X17220	94-535 nt	pGEM-T Easy	x
nptII	kanamycin/neomycin phosphotransferase	V00618	142-953 nt	pGEM-T Easy	x
Sp1	B-cell receptor prot. (IMAGE:1420858)	AF126021	270-1416 nt	pBluescript II SK	18 nt
Sp2	Myosin heavy chain (IMAGE:1593605)	X13988	5049-6032 nt	pBluescript II SK	19 nt
Sp4	Insulin-like growth factor (IMAGE:1576490)	X07868	3259-4037 nt	pBluescript II SK	18 nt

Tabela 2. Lista plazmidów z zestawu AFGC Microarray Control Set wykorzystanych jako kontrole

C.1.1.5. Znnormalizowana biblioteka cDNA

Znnormalizowana biblioteka cDNA 115/2 została przygotowana przez dr J. Podkowińskiego (IChB PAN, Poznań) z korzeni i brodawek łubinu wąskolistnego odmiany EMIR, infekowanych szczepem *B. japonicum* bv. genistaerum WM9. Do sporządzenia biblioteki użyto RNA wyizolowany z materiału zebranego 7- 14- i 21- dni po infekcji i wymieszany w stosunku 1:1:1. W trakcie syntezy do cDNA dołączono przez ligację sekwencje adapterowe, umożliwiające późniejszą amplifikację i klonowanie cDNA. Sekwencja (5' ATACGACTCACTATAGGGCTCGAG 3') bezpośrednio graniczy z końcem 5' każdego insertu. Sekwencja (5' AGTACTCTGCGTTGTTACCACTGCT 3') graniczy bezpośrednio z końcami 3' insertów. Startery komplementarne do tych odcinków adapterowych to odpowiednio: LAVecF i LAVecR. Normalizację przeprowadzono w oparciu o procedurę opisaną przez [Ko 1990], bez etapu fragmentacji DNA, osiągając co najmniej kilkudziesięciokrotną redukcję różnicy w stężeniu wysoko- i niskoreprezentowanych transkryptów [Kisiel i wsp. 2004]. Znnormalizowany cDNA wklonowano do wektora fagmidowego ZAP II XR (Stratagene), a następnie wyintegrowano plazmidowy DNA

z insertami. Uzyskana biblioteka 115/2 zawiera niefrakcjonowany cDNA o średniej długości insertu 1 kb. Miano biblioteki wynosi 20×10^3 cfu/ml, z czego 70 % stanowią rekombinanty z insertem cDNA.

C.1.2. Enzymy

Enzym*	Producent
Polimeraza Taq DNA	Fermentas
Ligaza DNA T4	Fermentas
Terminalna transferaza deoksynukleotydylowa (TdT)	Fermentas
Odwrotna transkryptaza M-MuLV	Fermentas

Tabela 3. Lista stosowanych enzymów

*Odpowiednie bufony do reakcji dostarczano wraz z enzymem

C.1.3. Zestawy do wykonywania reakcji

Nazwa zestawu	Przeznaczenie	Producent
RNeasy Plant Mini Kit	Izolacja całkowitego RNA z roślin	QIAGEN
DNeasy Plant Mini Kit	Izolacja genomowego DNA z roślin	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	Izolacja plazmidowego DNA	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	Izolacja DNA z żelu agarozowego	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	Oczyszczanie produktów PCR	QIAGEN
MinElute 96 UF PCR Purification Kit	Oczyszczanie produktów PCR w systemie mikroplitek	QIAGEN
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Sekwencjonowanie DNA	Applied Biosystems
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Znakowanie ss cDNA	Fermentas
HexaLabel™ DNA Labeling Kit	Znakowanie ds DNA	Fermentas
TA Cloning® Kit	Klonowanie DNA do wektora PCR® 2.1	Invitrogen

Tabela 4. Lista używanych zestawów do wykonywania reakcji

C.1.4. Markery długości DNA

Marker	Producent
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use	Fermentas

Tabela 5. Lista używanych markerów długości DNA

C.1.5. Oligonukleotydy

Startery oligonukleotydowe pochodziły z IBB PAN lub SIGMA-ARK GmbH. Liofilizowany DNA rozpuszczano w dejonizowanej sterylnej wodzie. Przygotowane porcje 100 μ M przechowywano w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i używano do sporządzania roztworów reakcyjnych.

C.1.5.1. Startery uniwersalne

Nazwa	Sekwencja (5' \rightarrow 3')	Temperatura topnienia*
JP203	CGGCCAGTGAATTGTAATACG	53,9 $^{\circ}\text{C}$
JP204	ATGACCATGATTACGCCAAGC	55,7 $^{\circ}\text{C}$
JP205	CGCCTGAATTCTAGATAG	46,5 $^{\circ}\text{C}$
JP206	CTAGATAGGTACCGTCGACG	53,6 $^{\circ}\text{C}$
JP207	CGCCTGAATTCTAGATAGGTACCGTCGACGTTTTTTTTTTTTTTTT	63,3 $^{\circ}\text{C}$
LAVecF	ATACGACTCACTATAGGGCTCGAG	57,1 $^{\circ}\text{C}$
LAVecR	AGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT	60,0 $^{\circ}\text{C}$
univM13F	GTTTTCCAGTCACGACGTTG	56,5 $^{\circ}\text{C}$
univM13R	TGAGCGGATAACAATTCACACAG	55,6 $^{\circ}\text{C}$
RACE-FL	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTT	61,4 $^{\circ}\text{C}$
RACE-FS	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	60,1 $^{\circ}\text{C}$

Tabela 6. Lista wykorzystanych starterów uniwersalnych

* Temperaturę topnienia obliczano wg programu OligoAnalyzer 3.0 (IDT)

C.1.5.2. Startery do amplifikacji i sekwencjonowania indywidualnych klonów

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Temperatura topnienia*
2072F	TGGTTGACATTGTACGCGAGT	56,8 °C
224F	GTAAGCAACTCCAACAGAACC	53,8 °C
225F	GGTTCTGTTGGAGTTGCTTAC	53,8 °C
43RACE0	GGAAACACCCCAATATATTGAA	50,6 °C
43RACE1	GGTTACATGTTCTAAGTCT	49,0 °C
43RACE2	CAACCTATTCTATTGAACTCAA	50,4 °C
43RACE3	GCAAAGCATCCCACCAAGTA	55,6 °C
AZ_28	GGAGACAGAATCAAGTGAATGATACTCA	56,2 °C
F1NFR1	TGTGATNTAGCYTAGCTTCNTA	53,1 °C
LA001	GAACARTTCAGTGATGGAGTTGG	45,7 °C
LA002	GCAATCAATGTCATTTCTCATCTC	54,5 °C
LA003	TGCTGGTGCTCACACTAATTACAG	57,1 °C
LA004	GGTGACACNGGCACAGATTGCAT	54,3 °C
LA005	GAATGGCGYGCYTTGATGGATC	54,5 °C
LA006	CGTATTSAMGAGAAGTACACA	50,8 °C
LA007	GAGGATACYTTCATTGCTG	49,1 °C
LA008	CTAAAGATGCCAAATATTCATTTC	48,6 °C
LA010F	GATATNGCNAAYGTYAAGGGAGT	54,6 °C
LA101	TCCTWCTCAGAATCCACAGAATAT	53,0 °C
LA102	TGNCAATTGAGCCTTATGA	50,2 °C
LA103	CCACCGGTGMAYAAGCCA	58,3 °C
LA106	GCTTTTGTGWTKGAATTCATAAT	49,31 °C
LA107	TCATAAGTACCGAACCACTAAATT	51,9 °C

LA201	GAWCCWTAYATNAAGAAGCTTGT	50,6 °C
LA203	GACAARGATGGHGAAGCTGGATG	55,1 °C
LA205F	TCTGCAACTVAAGGGTTTGAGA	55,6 °C
LA207R	TTCATGTAYTCAGATGCATTGTTTC	53,4 °C
LA208F	TGTGATNTAGCYTAGCTTCNTA	53,1 °C
LA209R	ACTGTNAWYTGTTCTNTGTGG	51,6 °C
LA214R	TCTYYWAGYCTWGGATCCACCA	56,1 °C
LA215F	TGCAARAGCCAGTAACATAGA	52,8 °C
LA217R	ATCCTTCCACAGCATAACCA	53,8 °C
LA219R	ATCTTGAGAACAGAATCAAT	53,8 °C
LA302	CCVATHWCCAARTGGGAAGAT	53,6 °C
LA303	CAYCCHGGTGGACCTGCAATT	59,8 °C
Lang_GS_FORWARD_1_	ATGCCDGGYCARTGGRRTTYCAAGTTGG	65,7 °C
M_ACTIN_007	YTVGAYTCTGGDGATGGTGT	54,7 °C
M_PEPC_002	CTBCGHGCDATHCCWTGGATCTTTGC	61,2 °C
M10_E40F	CTCAYYCCTCACACTCC	51,7 °C
M11_E40R	CCTACYWCTCATCTGCA	49,4 °C
NFR5-R5	TAGGCTGCCACACATAAGTAATCA	56,0 °C
NFR5-R6	AAGGGCACCTGCAGAATAAAGGGA	60,6 °C
R1NFR1	TCTYYWAGYCTWGGATCCACCA	56,1 °C
SYMRK-R1	GAATGGAAATATGCCCTTA	49,8 °C
SYMRK-R2	AGCATCTCTTCCCTCATCTATATCA	55,0 °C
SYMRK-R4	ACTATAATCTGTTGTGTAAT	43,3 °C
S2EST10	TTGCAGATTCTGATGAAACCCCAT	56,9 °C

Tabela 7. Lista wykorzystanych starterów specyficznych do poszczególnych sekwencji

* Temperaturę topnienia obliczano wg programu OligoAnalyzer 3.0 (IDT). W przypadku starterów o zdegenerowanej sekwencji podano średnią temperaturę topnienia.

C.1.6. Inne materiały i odczynniki

Nazwa	Producent
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP 3000Ci/mmol	ICN Biomedicals
[$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP 3000Ci/mmol	ICN Biomedicals
Agar	Prona, Sigma
Agaroza	Prona
Ampicylina	Sigma
Bactotrypton	Serva
Bromek etydyny	Sigma
Bromofenol blue	Sigma
BSA	Sigma
Chlorek cezu	Serva
Chlorek litu	Sigma
Chlorek sodu	POCh SA
DEPC	Sigma
DNA ze spermy śledzia	Sigma
dNTP	Promega, Fermentas
EDTA	Sigma
Ekstrakt drożdżowy	Serva
Etanol	POCh SA
Fenol	Sigma
Ficol typ 400	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Sigma
Glicerol	Sigma
Ksilen-cyjanol FF	Sigma
Mannitol	Fluka

Membrana Hybond N ⁺	Amersham BioSciences
MES	ICN Biomedical
MOPS	Sigma
Octan amonu	POCh SA
Octan sodu	POCh SA
Parafilm	Pechiney
PVP	Sigma
SDS	Sigma
Sephadex G-50 Fine	Sigma
Tris	POCh SA
TSR	Applied Biosystems
X-Gal	Sigma
β-merkaptioetanol	Sigma
Ekran wzmacniający Storage Phosphor Screen	Kodak, Amersham Biosciences
Kaseta do radiografii	Molecular Dynamics

Tabela 8. Lista innych wykorzystanych materiałów i odczynników

Pozostałe odczynniki pochodziły z POCh SA oraz z Sigma

C.1.7. Pożywki

C.1.7.1. Pożywki do hodowli bakterii

Podłoża stałe miały skład identyczny jak płynne i zawierały dodatkowo agar w stężeniu 15 g/l. Pożywki po rozpuszczeniu składników sterylizowano przez 20 min w temp. 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 bar. Gotowe pożywki przechowywano w temp. 4 °C.

LB do hodowli *E. coli*:

NaCl	10 g/l
Baktotrypton	10 g/l
Ekstrakt drożdżowy	5 g/l

SOC do hodowli *E. coli* po transformacji:

wg [Sambrook i Russel 2001]

YMB do hodowli *Bradyrhizobium japonicum*:

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,1 g/l
NaCl	0,1 g/l
Mannitol	10 g/l
Ekstrakt drożdżowy	0,4 g/l

C.1.7.2. Pożywka do hodowli roślin

Roztwór	Związek	Stężenie końcowe	
		Rośl. nieinfekowane	Rośl. infekowane
A2	MgSO ₄	2,0 mM	2,0 mM
B	FeSO ₄	0,1 mM	0,1 mM
	Na ₂ EDTA	0,1 mM	0,1 mM
C	CaCl ₂	1,7 mM	1,7 mM
EPF	MnSO ₄	83,0 μM	83,0 μM
	MnCl ₂	23,0 μM	23,0 μM
	KJ	5,0 μM	5,0 μM
	ZnSO ₄	30 μM	30 μM
	CoCl ₂	0,1 μM	0,1 μM
	CuSO ₄	0,32 μM	0,32 μM
	H ₃ BO ₃	100 μM	100 μM
	Na ₂ MoO ₄	1,0 μM	1,0 μM
D	KNO ₃	10 mM	-
I	NH ₄ H ₂ PO ₄	2,0 mM	-
J	Ca(NO ₃) ₂	2,1 mM	-
A3	K ₂ SO ₄	-	4,9 mM
A4	KCl	-	1,3 mM
F	KH ₂ PO ₄	-	2,0 mM

Tabela 9. Roztwory używane do sporządzenia pożywki do hodowli roślin (wg. P. Stróżyckiego, IChB PAN)

Pożywkę przechowywano w 4 °C w postaci roztworów stężonych stu- lub dwustukrotnie, które rozcieńczano i mieszano bezpośrednio przed podlaniem roślin.

C.1.8. Roztwory

C.1.8.1. Roztwory do izolacji całkowitego RNA z roślin

Wszystkie roztwory sterylizowano w temp. 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 bar przez 20 min.

GHCH, pH 7,0

Chlorowodorek guanidyny	8 M
MES	20 mM
EDTA	20 mM
β-merkaptotanol	50 mM

GTC, pH 7,0

Tiocyanian guanidyny	4 M
Cytrynian sodu	25 mM
Sarkozyl	0,5 %
β-merkaptotanol	100 mM

H₂O-DEPC

DEPC	1ml / l
------	---------

Przed sterylizacją roztwór wytrząsano przez 16 h w temp. pokojowej.

C.1.8.2. Roztwory do elektroforezy DNA**50x TAE:**

wg. [Sambrook i Russel 2001]

6x roztwór obciążający:

wg. [Sambrook i Russel 2001]

C.1.8.3. Roztwory do elektroforezy RNA**5x MOPS, pH 7,0**

MOPS	10 M
Octan sodu	10 mM
EDTA	10 mM

Roztwór sterylizowano w temp. 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 bar przez 20 min.

Roztwór denaturujący do próbek

5x MOPS	200 µl/ml
Formaldehyd	50 µl/ml
Dejonizowany formamid	500 µl/ml

Roztwór obciążający

Glicerol	400 µl/ml
1% Bromofenol blue	80 µl/ml

C.1.8.4. Roztwory do transferu i hybrydyzacji

Roztwory: 20 x SSC, denaturujący i neutralizujący sterylizowano w temp. 121 °C, pod ciśnieniem 1,5 bar przez 20 min.

20 x SSC, pH 7,0

NaCl	4 M
Cytrynian sodu	0,3 M

Roztwór denaturujący

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Roztwór neutralizujący, pH 7,5

NaCl	1,5 M
Tris	0,5 M

100 x Denhardt

BSA	2 g/100 ml
Ficol typ 400	2 g/100 ml
PVP	2 g/100 ml

Bufor do prehybrydyzacji / hybrydyzacji

20x SSC	5 x
100x Denhardt	5 x
SDS	0,5 %

DNA ze spermy śledzia* 100 µg/µl

*DNA ze spermy śledzia uprzednio degradowano przez wielokrotne przeciąganie przez strzykawkę z igłą, a bezpośrednio przed dodaniem denaturowano w temp. 95 °C przez 5 min i chłodzono na lodzie.

C.1.8.5. Pozostałe roztwory

TE

wg [Sambrook i Russel 2001]

10x TEN

wg [Sambrook i Russel 2001.]

C.1.9. Ważniejsza aparatura

Wirówki

5810 R z chłodzeniem, rotory F-45-30-11, F-34-6-38, A-2-DWP (Eppendorf)

5415R z chłodzeniem, rotor F-45-24-11 (Eppendorf)

J2-21 z chłodzeniem, rotory JA-17, JS-7.5 (Beckman)

Ultrawirówka XL-70 z chłodzeniem, rotor SW 40TI (Beckman)

Termocyklery

PTC-200 (MJ Research)

UNOII (Biometra)

Spektrofotometr

DU-62 (Beckman)

Licznik scyntylicyjny

LS 5000 TA (Beckman)

Hybrydyzator

7601 (GFL)

System do wizualizacji radioaktywności i fluorescencji

Typhoon 8600 (Molecular Dynamics)

Sekwenator

AbiPrism 310 (Applied Biosystems)

C.2. Metody

C.2.1. Hodowla roślin

Nasiona sterylizowano powierzchniowo w 25 % wybielaczu Clorox (*L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. albus*, *L. arizonicus*, *L. albicaulis*, *L. cosentinii*, *M. atropurpureum*, *O. compressus*) lub w stężonym kwasie siarkowym (pozostałe rośliny) przez 20 min, delikatnie mieszając, po czym płukano je obficie wodą destylowaną i moczo w niewielkiej ilości wody przez ok. 4 h. Następnie wykładano je na szalki pokryte wilgotną bibułą filtracyjną i inkubowano w temp. pokojowej, w ciemności, aż do skielkowania (*L. angustifolius* - 1 dzień, pozostałe rośliny – przez 1-5 dni). Siewki umieszczano w sterylnych doniczkach z perlitem na głębokości ok. 1 cm. Rośliny

hodowano w pomieszczeniu hodowlanym (temp. 24 °C, oświetlenie 16 h / dobę). Do czasu pojawienia się liścieni na powierzchni, doniczki przykrywano pokrywkami w celu zapobieżenia nadmiernej utracie wilgotności. Rośliny podlewano wodą, a raz w tygodniu – pożywką z dodatkiem mineralnego azotu. Hodowle łubinu wąskolistnego, przeznaczone do badania stadiów rozwoju brodawek korzeniowych polewano zawiesiną bakterii *B. japonicum* bv. *genistareum* WM9, podaną przy pomocy pipety (2 ml zawiesiny w pobliżu każdej rośliny), po 4-5 dniach od wysiania. Infekowane rośliny podlewano pożywką bezazotową. Materiał roślinny zamrażano w ciekłym azocie bezpośrednio po zebraniu i przechowywano w temp. -70 °C.

C.2.2. Hodowla bakterii

Bakterie przechowywano na szalkach ze stałą pożywką, w temp. 4 °C, przez krótki okres – do kilku tygodni lub zamrażano w 25 % glicerolu w temp. -70 °C. W tym celu przenoszono 500 µl płynnej hodowli do 1,5-ml probówki, mieszano delikatnie z równą objętością 50 % glicerolu i zamrażano błyskawicznie na suchym lodzie, po czym przenoszono do zamrażarki.

C.2.2.1. *Escherichia coli*

Komórki *E. coli* hodowano w płynnej lub stałej pożywce LB z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml). Hodowlę prowadzono przez ok. 16 godzin, w temp. 37 °C. Płynną hodowlę wytrząsano z szybkością 250 – 350 rpm. Przy kolorymetrycznym oznaczaniu aktywności enzymu β-galaktozydazy (selekcja białych i niebieskich kolonii), na powierzchni zestalonej pożywki na szalkach Petriego rozprowadzono równomiernie 40 µl X-Gal rozpuszczonego w dimetyloformamidzie (40 mg/ml) i inkubowano przez co najmniej 30 min w temp. 37 °C, bezpośrednio przed wysianiem bakterii.

C.2.2.2. *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistaeum*

Bakterie hodowano w płynnej lub stałej pożywce YMB, w temp. 28 °C przez ok. 5 dni. Płynną hodowlę wytrząsano z szybkością 200 rpm.

C.2.3. Izolacja roślinnego RNA

W każdej z zastosowanych metod zamrożony materiał roślinny ucierano na drobny proszek w moździerz schłodzonym ciekłym azotem. Odpowiednią ilość utartego materiału przenoszono do próbówki i, po odparowaniu resztek azotu, przystępowano do izolacji zgodnie z protokołem. Gotowe preparaty całkowitego RNA przechowywano w temp. -70°C .

C.2.3.1. Metoda GHCH-LiCl

Proszek uzyskany z utarcia 5 g materiału roślinnego zawieszano w 7,5 ml buforu GHCH i 7,5 ml fenolu. Całość mieszano homogenizatorem Polytron, przy maksymalnych obrotach, kilka razy po 30 s, w międzyczasie chłodząc probówkę na lodzie. Ekstrakcję przeprowadzano wytrząsając probówkę przez 10 min w temp. pokojowej. Do roztworu dodawano następnie równą objętość mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24 : 1) i wytrząsano przez kolejne 10 min. Mieszaninę wirowano (10 000 rpm, 10 min) w temp. 4°C , po czym fazę wodną przenoszono do nowej próbówki i ekstrahowano jeszcze dwukrotnie, najpierw równą objętością mieszaniny P:C:I (fenol : chloroform : alkohol izoamylowy 25 : 24 : 1), a później równą objętością chloroformu, wytrząsając i wirując jak poprzednio. Po ostatecznej ekstrakcji fazę wodną przenoszono do nowej próbówki, dodawano 0,2 objętości 1 M kwasu octowego i 0,7 objętości etanolu, po czym wytrącano w temp. -20°C , przez noc. Po wirowaniu (14 000 rpm, 30 min) w temp. 4°C supernatant usuwano, a osad przemywano 80 % etanolem, osuszano i rozpuszczano w 1 ml $\text{H}_2\text{O-DEPC}$. RNA wytrącano dodając 1/3 objętości 8 M chlorku litu, przez 3 - 24 h, w temp. 4°C . Supernatant oddzielano przez półgodzinne wirowanie (14 000 rpm) w temp. 4°C , a osad przemywano 2 M chlorkiem litu, następnie 80 % etanolem, osuszano i rozpuszczano w $\text{H}_2\text{O-DEPC}$. W celu usunięcia pozostałości chlorku litu RNA ponownie przetrącano, tym razem podwójną objętością etanolu i 0,1 objętości 3 M octanu sodu, pH 5.2. Po całonocnej inkubacji w temp. -20°C osad RNA wirowano jak poprzednio, przemywano 80 % etanolem, osuszano i rozpuszczano w 50 – 200 μl $\text{H}_2\text{O-DEPC}$.

C.2.3.2. Metoda GTC-CsCl

8 g utartego materiału roślinnego zawieszano w 10 ml buforu GTC i homogenizowano przy użyciu aparatu Polytron, na najwyższych obrotach, dwa razy po 30 s, w przerwach

chłodząc roztwór na lodzie. Probówki wytrząsano przez 20 min w temp. pokojowej, a następnie roztwór nawarstwiano na poduszkę z 5,7 M chlorku cezu i 100 mM EDTA, pH 7,0, w probówkach do ultrawierowania. Wirowanie prowadzono przez około 24 godziny, w temp. 20 °C, przy szybkości 36 000 rpm. Zebrany osad rozpuszczono w buforze GHCH, a następnie dwukrotnie przetrącano podwójną objętością etanolu i 0,1 objętością octanu sodu, pH 5,2. Każdorazowo preparat inkubowano w temp. –20 °C przez noc, wirowano (14 000 rpm, 40 min) w temp. 4 °C, przemywano 70 % etanolem, suszono i rozpuszczano w 50 – 200 µl H₂O-DEPC.

C.2.3.3. Metoda GTC-PVP-LiCl

Po utarciu 10 g materiału roślinnego proszek zawieszano w 30 ml buforu denaturującego GTC i homogenizowano kilkakrotnie przez 30 s przy użyciu aparatu Polytron, przy maksymalnych obrotach, w przerwach chłodząc mieszaninę na lodzie. Następnie dodawano 7,5 ml 10 % PVP i powtarzano homogenizację. Roztwór wirowano (11 000 rpm, 4 min) w temp. 20 °C. Zebrany supernatant ekstrahowano mieszaniną P:C:I, wytrząsając przez 1 min, inkubowano na lodzie przez 15 min, po czym wirowano (11 000 rpm, 10 min) w temp. 4 °C. Do zebranej fazy wodnej dodawano równą objętość izopropanolu i wytrącano przez noc w –20 °C. Następnie, po półgodzinnym wirowaniu (14 000 rpm) w temp. 4 °C i usunięciu supernatantu, osad przemywano 80 % etanolem, osuszano i rozpuszczano w 1 ml H₂O-DEPC. RNA przetrącano następnie kolejno: chlorkiem litu i etanolem, identycznie jak w metodzie GHCH-LiCl.

C.2.3.4. Metoda RNeasy

Izolację prowadzono przy użyciu zestawu kolumnkowego RNeasy Plant Mini Kit, zgodnie z zaleceniami producenta, używając 100 mg utartego materiału roślinnego na pojedynczą izolację. Wybrano zalecaną przez producenta opcję ekstrakcji w buforze GITC, dostępnym w zestawie. RNA wmywano z każdej kolumnki 2 x 100 µl wody wolnej od RNaz. Następnie łączono wszystkie eluaty uzyskane z tego samego materiału roślinnego i zagęszczano RNA przez całonocne przetrącanie w –20 °C etanolem z dodatkiem octanu sodu i wirowanie, tak jak w pozostałych metodach izolacji.

C.2.4. Izolacja całkowitego DNA z roślin

Zamrożony materiał roślinny ucierano na drobny proszek w moździerz chłodzonym ciekłym azotem. Izolację DNA prowadzono następnie przy użyciu zestawu kolumnkowego DNeasy Plant Mini Kit, zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. W pojedynczej izolacji ekstrahowano DNA ze 100 mg proszku roślinnego. DNA wmywano z kolumnek używając 2 x 75 µl wody wolnej od RNaz. Gotowe preparaty przechowywano w temp. 4 °C.

C.2.5. Izolacja plazmidów z komórek *E. coli*

Kultury bakterii po całonocnej hodowli w 5 ml pożywki LB z antybiotykiem, oddzielano od pożywki przez wirowanie (4 500 rpm, 15 min) w temp. 4 °C. Następnie zlewano pożywkę, a z osadu bakterii izolowano plazmidy używając zestawu kolumnkowego QIAprep Spin Miniprep Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. DNA wmywano z kolumnek 50 µl buforu EB, dołączanego do zestawu i przechowywano w -20 °C.

C.2.6. Analiza spektrofotometryczna kwasów nukleinowych

Stężenie kwasów nukleinowych oceniano spektrofotometrycznie, badając ich absorpcję w wodzie przy długości fali 260 nm i przyjmując przelicznik 1OD = 40 µg/ml RNA lub 50 µg/ml ds DNA. W celu zbadania czystości preparatów RNA mierzono stosunek absorpcji przy długości fali 260 nm do absorpcji przy długości 280 nm, w buforze TE, pH 8,0. Jako prawidłowe przyjmowano wartości 1,8 – 2,2.

C.2.7. Elektroforeza DNA

Próbki obciążano roztworem obciążającym z dodatkiem bromofenolu blue i ksylencyjanolu. DNA rozdzielano w 1,5 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w ilości 0,5 µg/ml. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TAE przez 35 – 60 min, przy natężeniu pola elektrycznego 5 – 9 V/cm. Obraz prążków po rozdziale uzyskiwano skanując żel na aparacie Typhoon 8600, przy użyciu filtra wzbudzenia 532 nm i filtra emisji 610 nm. Jeśli rozdział prowadzono w celu oszacowania stężenia preparatów, do

żelu nie dodawano bromku etydyny. W tym przypadku żel wybarwiano po elektroforezie w pudełku z buforem 1x TAE i bromkiem etydyny (1 µg/ml), w temp. pokojowej, przez 2 – 4 h, lekko kołysząc. Następnie zastępowano bufor wodą destylowaną i kołysano jeszcze przez 15 min, po czym zbierano obraz fluorescencji.

C.2.8. Elektroforeza RNA

1-2 µg całkowitego RNA liofilizowano (jeśli objętość przekraczała 2 µl), rozpuszczano w 10 µl buforu denaturującego do próbek i inkubowano przez 7 min w temp. 65 °C, po czym schładzano na lodzie i krótko wirowano (13 000 rpm) w celu zebrania roztworu na dnie próbówki. Do próbek dodawano po 1,5 µl buforu obciążającego i rozdzielano je w 1,5 % żelu agarozowym, w warunkach denaturujących (z dodatkiem 5 % v/v formaldehydu), w buforze 1x MOPS. Elektroforezę prowadzono przez ok. 1 h, przy natężeniu pola elektrycznego 6 V/cm. Żel wybarwiano po elektroforezie, inkubując go przez 2 - 4 h w pudełku z buforem 1x MOPS i bromkiem etydyny (1 µg /ml), a następnie przez 15 min w sterylnej wodzie, lekko kołysząc. Obraz prążków po elektroforezie uzyskiwano skanując żel na aparacie Typhoon 8600 przy długościach fali 532 / 610 nm.

C.2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji

W 200-µl próbówce do PCR mieszano:

całkowity RNA	1,5 µg
10 µM starter	3,6 µl
woda	do obj. 12 µl

Mieszaninę inkubowano w temp. 70 °C przez 5 min, chłodzono na lodzie i krótko wirowano (13 000 rpm). Następnie do próbówki dodawano:

5 x bufor RT	4 µl
10 mM dNTP	2 µl

20 U/ μ l RNasin	1 μ l
----------------------	-----------

Całość inkubowano w temp. 37 °C przez 5 min. Następnie dodawano enzym:

200 u/ μ l odwrotna transkryptaza	1 μ l
---------------------------------------	-----------

Reakcję prowadzono przez 60 min w temp. 42 °C, po czym dezaktywowano enzym przez dziesięciominutową inkubację w 70 °C.

C.2.10. Amplifikacja PCR

Reakcję amplifikacji przeprowadzano przy użyciu enzymu Polimerazy Taq DNA, w buforze zawierającym siarczan amonu.

Skład standardowej mieszaniny reakcyjnej:

10x bufor do PCR	1x
25 mM MgCl ₂	2 mM
10 mM dNTP	0,2 mM
(5 – 100 μ M) starter F	0,3 – 0,6 μ M
(5 – 100 μ M) starter R	0,3 – 0,6 μ M
matrycowy DNA	zależnie od rodzaju matrycy
H ₂ O	zależnie od objętości reakcji
5 u/ μ l Polimeraza Taq	2 u/100 μ l

Rodzaje stosowanych matryc DNA:

zabite bakterie – kolonię bakterii podnoszono z szalki przy pomocy sterylnej wykałaczki, zawieszano w 150 μ l buforu TE i wytrząsano na wortexie przez ok. 5 min. Następnie próbkę inkubowano w temp. 95 °C przez 7 min i chłodzono na lodzie.

Zdenaturowaną próbkę wirowano (10 000 rpm, 2 min) w temp. 4 °C. Supernatant stosowano jako matrycę w reakcji PCR, w ilości 3 µl / 10-µl reakcję.

plazmidowy DNA – na 100-µl reakcję amplifikacji używano 1 µl pięćdziesięciokrotnie rozcieńczonego preparatu uzyskanego w standardowej izolacji. W przypadku braku produktu reakcję powtarzano stosując jako matrycę nie rozcieńczony DNA plazmidowy.

genomowy DNA z roślin – na 50-µl reakcję używano 10 µl preparatu uzyskanego w standardowej izolacji.

ss cDNA – na 10-µl reakcję używano 0,5 - 1 µl mieszaniny po odwrotnej transkrypcji.

Profil temperaturowy reakcji w termocyklerze:

wstępna denaturacja	94 °C	2 min
35 x:		
denaturacja	94 °C	45 s
hybrydyzacja	zmiennie*	1 min
wydłużanie	72 °C	1 min 30 s
końcowe wydłużanie	72 °C	10 min

Po reakcji próbki pozostawały w temp. 4 °C do czasu wyjęcia z termocyklera.

* Temperatura hybrydyzacji była zależna od zestawu użytych starterów.

C.2.11. Oczyszczanie produktów amplifikacji PCR

Produkty reakcji PCR oczyszczano w trojaki sposób. 1) Przy oczyszczaniu mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio po amplifikacji używano zestawu kolumnkowego QIAquick PCR Purification Kit, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. 2) W przypadku oczyszczania dużej ilości produktów PCR stosowano system płytek mikrostudzienkowych z 96 zagłębieniami oraz zestaw MinElute 96 UF PCR

Purification Kit. Przesączenie roztworów wymuszano stosując wodną pompę ssącą. 3) Niektóre preparaty oczyszczano przez rozdzielanie w żelu agarozowym i wycięcie z żelu prążków oczekiwanej długości, pod lampą UV. Następnie DNA eluowano z żelu stosując zestaw kolumnienkowy QIAquick Gel Extraction Kit, według procedury podanej przez producenta.

C.2.12. Znakowanie radioaktywne ss cDNA

Znakowany ss cDNA uzyskiwano w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z odpowiednich fragmentów rośliny. Do znakowania stosowano [α^{32} P]dCTP lub [α^{33} P]dCTP o aktywności 3000Ci/mmol. W reakcji RT używano zestaw RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, z niewielkimi modyfikacjami w procedurze podanej przez producenta.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

W 200- μ l probówce do PCR mieszano:

całkowity RNA	15 μ g
oligo (dT) ₁₈	4 μ g
woda	do obj. 7,5 μ l

Mieszaninę inkubowano w temp. 70 °C przez 5 min, chłodzono na lodzie i krótko wirowano (13 000 rpm). Następnie do próbki dodawano:

5 x bufor RT	4 μ l
10 mM (dATP, dGTP, dCTP)	1 μ l
0,25 mM dCTP	1 μ l
20 U/ μ l RNasin	1 μ l
[α^{32} P]dCTP lub [α^{33} P]dCTP	5 μ l

C.2.13. Znakowanie radioaktywne produktów PCR

Produkty PCR znakowano metodą heksamerową stosując zestaw HexaLabel™ DNA Labeling Kit i [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP o aktywności 3000 Ci/mmol, według zaleceń producenta. DNA po znakowaniu oczyszczano na kolumnkach z zestawu QIAquick PCR Purification Kit, zgodnie z dołączonym protokołem. Specyficzną aktywność wyznakowanego DNA mierzono w liczniku scyntylicyjnym. Bezpośrednio przed hybrydyzacją sondy denaturowano przez 5 min w temp. 95 °C i chłodzono na lodzie.

C.2.14. Hybrydyzacja kolonijna

Przygotowanie filtrów

Bakterie ze znormalizowanej biblioteki cDNA hodowano na szalkach Petriego z gęstością umożliwiającą odseparowanie pojedynczych kolonii (około 250/ szalkę, w tym 40 - 80 % rekombinantów z insertem, co oszacowywano na podstawie testu α -komplementacji). Następnie dokonywano transferu bakterii w niezmienionym układzie na filtry nylonowe, przykładając do powierzchni szalki odpowiednio przyciętą membranę i lekko przyciskając. Po rozdzieleniu filtry układano na szalkach ze świeżą pożywką LB i hodowano przez kilka godzin w temp. 37 °C, w celu zregenerowania kolonii. Macierzyste szalki również inkubowano przez kilka godzin w temp. 37 °C, a następnie przechowywano w temp. 4 °C do uzyskania wyników hybrydyzacji.

Po inkubacji filtry przenoszono na bibułę 3MM nasączoną roztworem denaturującym (na 4 min), a później na bibułę z roztworem neutralizującym (2 x 3 min), koloniami do góry. Po neutralizacji filtry płukano przez zanurzenie w 2x SSC i suszono w temp. pokojowej. DNA immobilizowano na membranach przez dwugodzinne zapiekanie w temp. 80 °C. Gotowe filtry przechowywano w temp. pokojowej w szczelnym zamknięciu.

Hybrydyzacja i wizualizacja

Filtry umieszczano w pudełku z 50 ml buforu do prehybrydyzacji i inkubowano przez 3 h w temp. 65 °C, kołysząc. Następnie do buforu dodawano ss cDNA znakowany

[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP i prowadzono hybrydyzację przez 15 h w tych samych warunkach. Po hybrydyzacji filtry obmywano w uprzednio podgrzanych roztworach inkubując je za każdym razem w temp. 65 °C, z kołysaniem:

2x SSC, 0,1 % SDS – dwukrotnie przez 5 min

1x SSC, 0,1 % SDS – 15 min

0,1x SSC, 0,1 % SDS – dwukrotnie przez 10 min

Na końcu filtry płukano pobieżnie w 2x SSC, zamykano szczelnie w przezroczystym worku i przykładano do ekranu wzmacniającego na kilka godzin. Po zeskanowaniu obrazu na aparacie Typhoon 8600 filtry w razie konieczności ponownie odmywano, a następnie suszono w temp. pokojowej i poddawano ekspozycji przez 24 -72 h.

C.2.15. Hybrydyzacja makromacierzy DNA o niskiej gęstości

Przygotowanie filtrów

W celu otrzymania sond DNA wybrane inserty namnażano w reakcji PCR (2 – 3 reakcje w objętości 100 μl dla każdej sondy). Zastosowano parę starterów LaVecF i LaVecR, a matrycę do amplifikacji stanowiły zabite bakterie. Produkty reakcji zagęszczano przez odparowanie w bloku termicznym nagrzanym do temp. 94 °C i rozpuszczenie w 25 μl wody. Bezpośrednio przed naniesieniem na filtry sondy denaturowano (5 min w temp. 95 °C), chłodzono na lodzie i wirowano, po czym dodawano do nich 2,5 μl 20x SSC. Na filtry nylonowe наносzono po 0,8 μl każdej sondy wg uprzednio przygotowanych szablonów. Każdorazowo przygotowywano dwa identyczne zestawy filtrów. Po naniesieniu wszystkich sond filtry pozostawiano na 15 min do wyschnięcia, a później zapiekano przez 2 h w temp. 80 °C. Gotowe filtry przechowywano w temp. pokojowej w szczelnym zamknięciu.

Hybrydyzacja i wizualizacja

Filtry umieszczano w tubach zawierających bufor do prehybrydyzacji i poddawano czterogodzinnej inkubacji w 65 °C. Następnie do tub dodawano odpowiednią próbę

ss cDNA wyznakowanego [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP i hybrydyzowano przez ok. 16 h. Filtry odmywano i poddawano ekspozycji w identyczny sposób, jak przy hybrydyzacji kolonijnej. Obraz zbierano z maksymalną rozdzielczością skanera ($50 \mu\text{m}^2$).

C.2.16. Hybrydyzacja makromacierzy DNA o wysokiej gęstości

Analizę ekspresji genów z zastosowaniem makromacierzy DNA o wysokiej gęstości przeprowadzono w dwóch powtórzeniach (por. punkt D.4.1). Do każdego z powtórzeń zestawy makromacierzy były przygotowywane niezależnie, z niewielkimi różnicami w procedurze.

Przygotowanie filtrów

Sondy przeznaczone do naniesienia na filtry otrzymywano przez amplifikację insertów z parami uniwersalnych starterów LaVecF i LaVecR, JP203 i JP204 lub univM13F i univM13R, zależnie od rodzaju plazmidu. Jako matryce do amplifikacji wykorzystano zabite bakterie (w pierwszym powtórzeniu) lub plazmidowe DNA wyizolowane z odpowiednich rekombinantów (w drugim powtórzeniu). Przeprowadzano 2 – 3 reakcje amplifikacji szacując stężenia otrzymywanych produktów na żelu agarozowym. Dla większości sond uzyskiwano w ten sposób co najmniej $3 \mu\text{g}$ DNA. Po amplifikacji produkty PCR oczyszczano i zagęszczano przez oczyszczanie systemem MinElute 96 UF PCR Purification Kit i elucję $30 \mu\text{l}$ wody. W pierwszym powtórzeniu eksperymentu sondy bezpośrednio przed naniesieniem denaturowano przez dodanie $5 \mu\text{l}$ $0,6 \text{ M}$ NaOH na $10 \mu\text{l}$ roztworu DNA i inkubację w temp. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 15 min. Następnie наносzono je w trzech powtórzeniach na membrany nylonowe przy pomocy 96-igłowego replikatora (Nalge Nunc International). W celu kontrolowania procesu nanoszenia, roztwory sond zabarwiano $0,001 \%$ bromofenolem blue. W drugim powtórzeniu eksperymentu sondy były denaturowane dopiero po naniesieniu na filtry, przez umieszczenie membran na bibule 3MM nasączonej roztworem denaturującym ($3 \times 10 \text{ min}$), a następnie buforem neutralizującym ($3 \times 10 \text{ min}$) i obmycie w $2 \times \text{SSC}$. Gotowe filtry zapiekano przez 2 h w temp. $80 \text{ }^\circ\text{C}$ i przechowywano szczelnie zamknięte w temp. pokojowej do czasu hybrydyzacji.

Hybrydyzacja i wizualizacja

Protokół hybrydyzacji zaczerpnięto z [Loriod i wsp. 2001]. Filtry umieszczone w tubach do hybrydyzacji inkubowano w temp. 68 °C przez minimum 6 h w buforze prehybrydyzacyjnym. Następnie dodawano odpowiednią próbę ss cDNA, znakowaną [$\alpha^{33}\text{P}$]dCTP i hybrydyzowano przez 48 h w tych samych warunkach. Po hybrydyzacji filtry odmywano (3 x 1 h w 0,1 % SSC i 0,1 % SDS) w temp. 68 °C i płukano je w 2x SSC. Zamknięte szczelnie w foliowych woreczkach membrany poddawano ekspozycji przez ok. 48 h i skanowano na aparacie Typhoon 8600. Po uzyskaniu wstępnego obrazu, filtry w razie potrzeby odmywano dodatkowo przez 1 h w takich samych warunkach jak poprzednio, suszono i poddawano ponownej ekspozycji przez ok. 7 dni. Odmywano zawsze oba odpowiadające sobie filtry reprezentujące porównywane stadia, tak aby czas odmywania był dla nich jednakowy. Obraz zbierano z maksymalną rozdzielczością skanera (50 μm^2).

C.2.17. Hybrydyzacja Northern

Przygotowanie filtrów

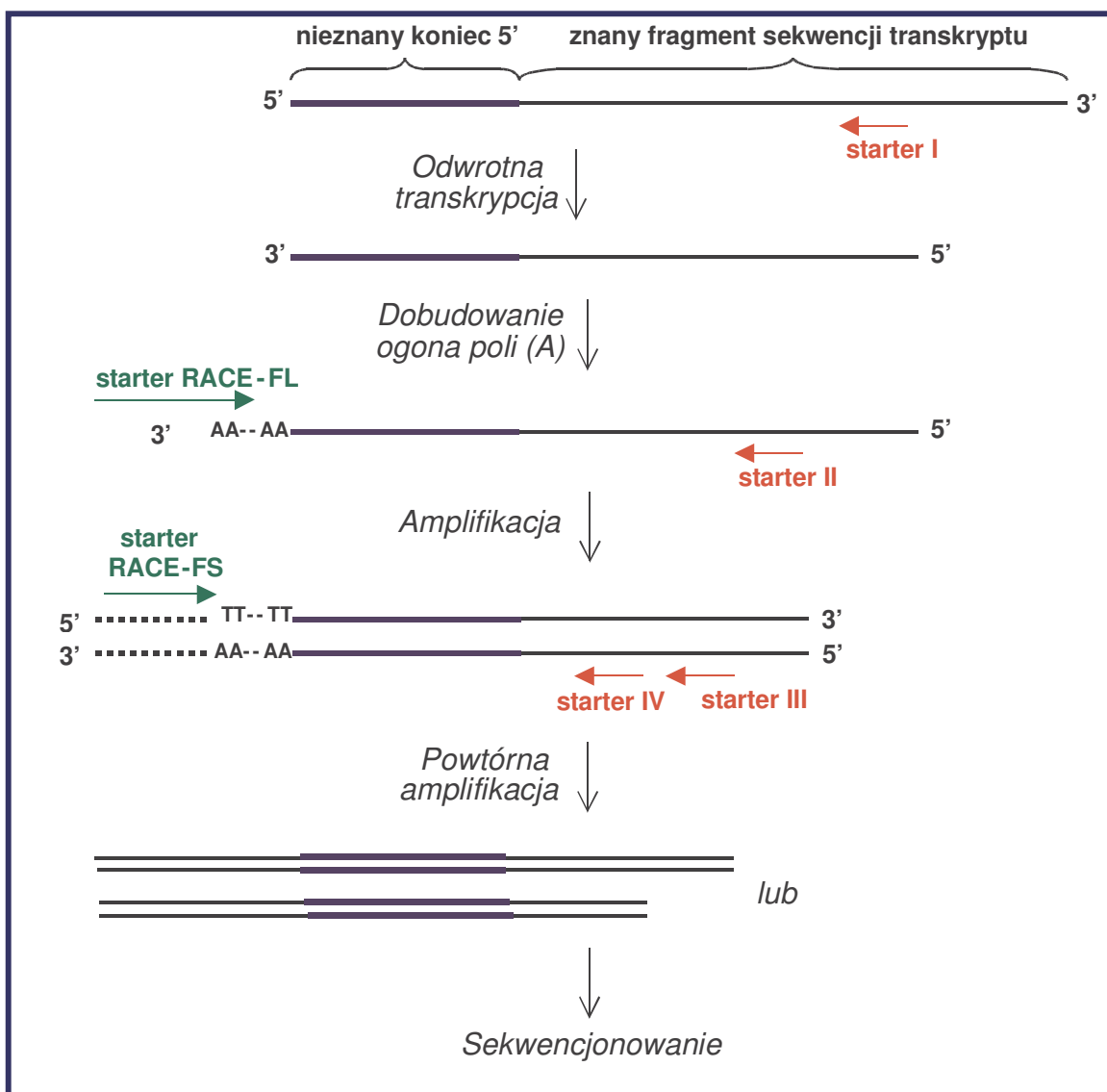
Po 5 μg całkowitego RNA rozdzielano w denaturującym żelu agarozowym. Następnie żel płukano w sterylnej wodzie oraz dwukrotnie w 10x SSC, każdorazowo przez 15 min. RNA przenoszono na membranę hybrydyzacyjną, suszono w temp. pokojowej i zapiekano w temp. 80 °C przez 2 h. Szczelnie zamknięte filtry przechowywano w temp. pokojowej do czasu hybrydyzacji.

Hybrydyzacja i wizualizacja

Filtry umieszczone w tubach do hybrydyzacji inkubowano w 5 μl buforu prehybrydyzacyjnego przez 2 h. Następnie dodawano odpowiednią sondę ds DNA, wyznakowaną [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP i hybrydyzowano przez kolejne 16 h. Po hybrydyzacji filtry płukano i poddawano ekspozycji, tak jak przy hybrydyzacji kolonijnej.

C.2.18. Ustalanie końca 5' transkryptu

W celu ustalenia końca 5' cDNA stosowano technikę 5' RACE, wykorzystując cztery startery oligonukleotydowe, komplementarne do regionu 5'-końcowego znanego fragmentu sekwencji. Starter I położony był najdalej, a starter IV – najbliżej końca 5' znanego fragmentu cDNA:



Rysunek 6. Schemat postępowania przy ustalaniu końców 5' transkryptów

Odwrótne transkrypcja

W reakcji odwrotnej transkrypcji używano specyficznego startera I. Jednociowy cDNA oczyszczano od niewbudowanych nukleotydów przy pomocy zestawu kolumnkowego

QIAquick PCR Purification Kit. Do elucji używano 50 μ l wody podgrzanej do temp. 65 °C.

Dobudowanie ogona poli(dA) na końcu 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej:

5x bufor TdT	5 μ l
oczyszczony ss cDNA	10 μ l
1 mM dATP	4 μ l
20 u/ μ l terminalna transferaza	2 μ l
H ₂ O	4 μ l

DNA w wodzie denaturowano przez 2 min w temp. 94 °C i chłodzono na lodzie, po czym dodawano resztę składników. Reakcję prowadzono przez 15 min w temp. 37 °C, następnie dezaktywowano enzym przez 10 min w temp. 70 °C i schładzano do temp. 4 °C.

Amplifikacja końca 5'

Przeprowadzano standardową reakcję PCR używając jako matrycę 4 μ l cDNA z ogonem poliadenozynowym oraz starter RACE-FL i specyficzny starter II. Produkty reakcji rozdzielano w żelu agarozowym. W przypadku braku widocznego prążka spodziewanej długości przeprowadzano powtórny amplifikację, na matrycy 1 μ l mieszaniny reakcyjnej z pierwszej reakcji PCR, używając starter RACE-FS oraz starter III lub starter IV. Otrzymaną pulę produktów cDNA klonowano do wektora plazmidowego, a następnie amplifikowano pewną ilość insertów i sekwencjonowano najdłuższe z nich.

C.2.19. Klonowanie produktów PCR do wektora plazmidowego

Do klonowania produktów PCR do wektora używano zestawu TA Cloning® Kit i komórek kompetentnych One Shot® INVαF'.

Ligacja

Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l. Produkt PCR bez oczyszczania mieszano z 50 ng zliniowanego plazmidu pCR[®] 2.1 w stosunku molarnym 3:1, dodawano 1 μ l 10x buforu do ligacji i 4 u ligazy. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temp. 14 °C przez noc.

Transformacja

2 μ l mieszaniny ligacyjnej dodawano do próbówki zawierającej 50 μ l komórek kompetentnych, mieszano delikatnie końcówką pipety i pozostawiano na lodzie przez 30 min. Następnie przeprowadzano transformację metodą szoku termicznego, zanurzając próbówkę na 30 s w łaźni wodnej, nagrzanej do temp. 42 °C i chłodząc na lodzie przez 2 min. Do schłodzonych komórek dodawano 250 μ l pożywki SOC i hodowano przez 1 h w temp. 37 °C, wytrząsając próbówkę z prędkością 225 rpm. Po tym czasie rozprowadzano 100 – 200 μ l zawiesiny komórek na szalkach LB z ampicyliną i X-gal, i inkubowano przez noc w temp. 37 °C. Rekombinanty selekcjonowano przesiewając białe kolonie i przeprowadzając kontrolne reakcje PCR na matrycy zabitych bakterii.

C.2.20. Sekwencjonowanie DNA

DNA sekwencjonowano automatycznie metodą terminacji łańcucha przez wbudowanie znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów oraz elektroforezę kapilarną. Do amplifikacji używano zestaw BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l.

Amplifikacja PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Terminator Ready Reaction Mix	2 μ l
-------------------------------	-----------

Big Dye Sequencing Buffer	1 μ l
1,6 μ M starter	1 μ l
matrycowy DNA:	
plazmid	200 ng
produkt PCR	10 ng
woda	do 10 μ l

Profil temperaturowy reakcji w termocyklerze:

wstępna denaturacja	96 °C	1 min
25 x:		
denaturacja	96 °C	10 s
hybrydyzacja	zmiennie*	10 s
wydłużanie	60 °C	4 min

Po reakcji próbki pozostawały w temp. 4 °C do czasu wyjęcia z termocyklera.

* Temperatura hybrydyzacji była zależna od zestawu użytych starterów.

Oczyszczanie produktu amplifikacji

Mieszaninę reakcyjną umieszczano w 1,5-ml próbówce i dodawano do niej 25 μ l etanolu o temp. pokojowej, 1 μ l 3M octanu sodu, pH 5,2 i 1 μ l 125 mM EDTA. Całość mieszano na wortexie i pozostawiano w temp. pokojowej na 15 min, po czym wirowano (40 min, 14 000 rpm) w temp. 4 °C. Po usunięciu supernatantu osad przemywano 100 μ l 80 % etanolu, suszono przez 10 min w temp. pokojowej i rozpuszczano przez co najmniej pół godziny w 10 μ l buforu TSR. Następnie próbkę denaturowano przez 2 min w temp. 95 °C, chłodzono na lodzie, krótko wirowano i przenoszono do 0,5-ml próbówki do elektroforezy kapilarnej.

Elektroforeza kapilarna

Elektroforezę prowadzono przez 120 min w sekwenatorze Abi Prism 310, w temp. 50 °C, przy natężeniu pola elektrycznego 200 V/cm. Czas iniekcji próby wynosił 30 s, a napięcie w czasie iniekcji - 2,5 kV.

C.2.21. Komputerowa obróbka i analiza danych

Do obróbki sekwencji używano zainstalowanego zdalnie lub lokalnie oprogramowania: BioEdit 4.8.10, GeneDoc 2.3.000, ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/#>), CAP (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/cap_in.pl), Signal P3.0 ([http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal P](http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal_P)) oraz zestawu aplikacji BCM Search Launcher: Sequence Utilities (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>).

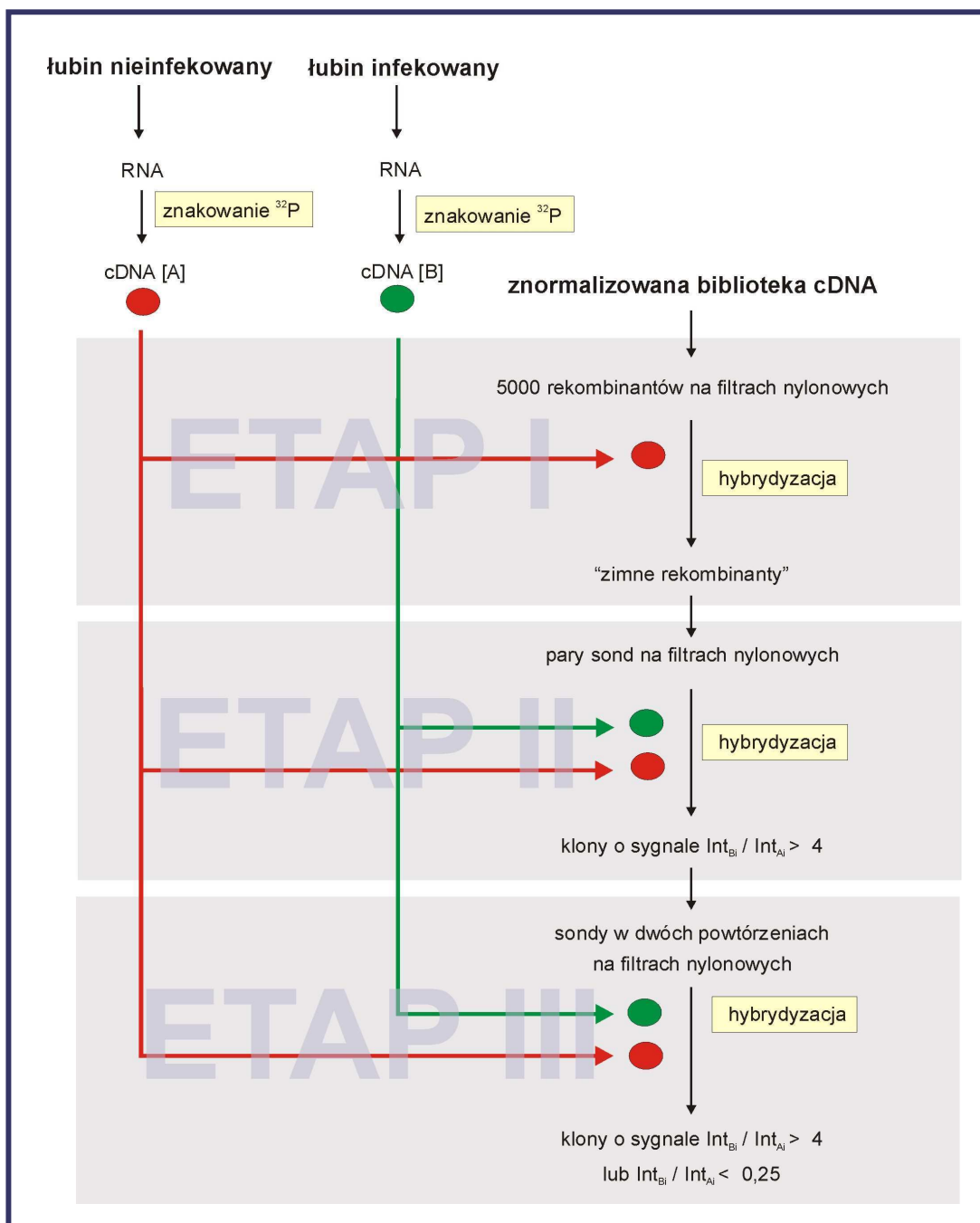
Przeszukanie baz danych prowadzono za pośrednictwem serwerów National Center for Biotechnology Information, The Institute for Genomic Research, ExPASy, Pfam, oraz EMBL-EBI, korzystając z dostępnych programów. W każdym rodzaju przeszukania jako wskaźnik znaczącego podobieństwa przyjmowano wartość oczekiwaną Expect < 10^{-04} .

Do analizy ilościowej wyników hybrydyzacji makromacierzy DNA używano programów ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics) oraz Excel 2000 (Microsoft). Na potrzeby analizy ilościowej obrazów fluorescencji i radiogramów każdorazowo stosowano opcję redukcji tła „*Local Average*”, a wyniki odczytywano w kolumnach wartości „*Volume*” (analiza stężeń RNA i DNA w żelach agarozowych, analiza ilościowa radiogramów) lub „*Sum Above Background*” (analiza ilościowa radiogramów).

D. WYNIKI

D.1. Selekcja genów o ekspresji modulowanej w symbiozie

Pierwsza część pracy eksperymentalnej polegała na wstępnej selekcji genów, które mogą być zaangażowane w rozwój i funkcjonowanie brodawek symbiotycznych łubinu wąskolistnego. W tym celu wykonano trzyetapowe przeszukanie znormalizowanej



Rysunek 7. Schemat trzyetapowego przeszukania znormalizowanej biblioteki cDNA, mającego na celu wyselekcjonowanie genów o podwyższonej lub obniżonej ekspresji w trakcie symbiozy z bradyrizobiami. Opis w tekście.

biblioteki cDNA przygotowanej z korzeni w różnych stadiach symbiozy z bakteriami *B. japonicum* bv. *genistaerum* WM9. Polegało ono na kolejnych hybrydyzacjach z radioaktywnie wyznakowanymi próbkami cDNA, pochodzącymi z korzeni roślin nieinfekowanych oraz zainfekowanych mikrosymbiontem (Rys. 7). Ostatecznym celem przeszukania było wybranie puli cDNA ulegających różnicowej ekspresji.

D.1.1. Optymalizacja procedur izolacji RNA i znakowania cDNA

Do analizy różnicowej użyto znakowane radioaktywnie [³²P] próby cDNA [A] oraz [B], otrzymane w reakcji odwrotnej transkrypcji, z zastosowaniem uniwersalnego startera oligo(dT)₁₈. Próbę [A] przygotowano na matrycy całkowitego RNA wyizolowanego z nieinfekowanych korzeni, hodowanych na podłożu z dodatkiem związanych form azotu. Do syntezy próby [B] użyto natomiast całkowity RNA wyizolowany z fragmentów zainfekowanych korzeni z dojrzałymi brodawkami (34 dpi).

W celu otrzymania matrycowych RNA do syntezy, zastosowano pierwotnie metodę GHCH-LiCl: ekstrakcję buforem zawierającym chlorowodorek guanidyny, a następnie mieszaniną fenol: chloroform: alkohol izoamyłowy (P:C:I), połączoną z przetrącaniem 2M chlorkiem litu. Pierwsze próby znakowania otrzymanego RNA wykazały, że mimo odpowiedniego stężenia i czystości preparatu, reakcje odwrotnej transkrypcji przebiegały z różną wydajnością, w zależności od użytej partii RNA. Podczas gdy w najbardziej udanych reakcjach znakowania udział cząsteczek [α -³²P]dCTP wbudowanych do cDNA sięgał 20 % wyjściowej ilości izotopu, w innych wartość ta była bliska zeru (Tab. 10). Zmienne wyniki uzyskiwano dla obu prób, ale szczególnie często dotyczyło to znakowania próby [B]. Całkowity RNA z korzeni z brodawkami również bardzo trudno rozpuszczał się w trakcie izolacji, a osad był białawy, a nie przezroczysty. Wyciągnięto stąd wniosek, że zastosowana procedura ekstrakcji i oczyszczania RNA nie pozwala na dokładne usunięcie jakiegoś metabolitu wtórnego, obecnego w tkankach roślinnych, który później inhibuje reakcję odwrotnej transkrypcji. Preparaty RNA poddano zatem dodatkowemu oczyszczaniu, przez powtórny ekstrakcję mieszaniną P:C:I. Następnie przeprowadzono serię kontrolnych reakcji znakowania, używając jako matrycę kontrolny RNA dołączony do zestawu (1,5 μ g / reakcję), sam lub w kombinacji z powtórnie oczyszczonym RNA z łubinu (5 μ g). Wykazały one, że dodanie do mieszaniny reakcyjnej RNA z łubinu nie obniżało poziomu syntezy

kontrolnego cDNA. Jednak wydajność znakowania prób [A] i [B] nie poprawiła się mimo oczyszczenia. Jedną z możliwych przyczyn mogła być degradacja matrycy, spowodowana wieloetapową procedurą izolacji. W związku z tym zdecydowano się na modyfikację tej procedury, zastępując wytrącanie chlorkiem litu separacją RNA przez wirowanie w gradiencie chlorku cezu (metoda GHCH-CsCl). Wyeliminowano w ten sposób przypadki całkowicie nieudanego znakowania, jednak w dalszym ciągu uzyskiwano niepowtarzalne wyniki (Tab. 10). W równoległe wypróbowanej metodzie GTC-PVP-LiCl zastosowano denaturację w buforze zawierającym tiocyjanian guanidyny, z dodatkiem poliwinylpirolidonu (PVP), połączoną z ekstrakcją mieszaniną P:C:I i przetrącaniem chlorkiem litu. Tiocyjanian guanidyny ma większe właściwości denaturujące i lepiej rozrywa komórki niż chlorowodorek guanidyny, natomiast PVP tworzy kompleksy z powszechnymi w tkankach roślinnych polisacharydami i związkami polifenolowymi. Przetestowany preparat RNA wyizolowany tym sposobem rzeczywiście okazał się dobrą matrycą do odwrotnej transkrypcji - przeprowadzono jedno próbne znakowanie, w czasie którego do syntetyzowanego cDNA wbudowało się około 20% cząsteczek [α - 32 P] dCTP (Tab. 10). Jednak wydajność izolacji (50 μ g RNA/ 1 g świeżej masy) nie była zadowalająca.

Metoda izolacji	Czas trwania	Wydajność izolacji (μ g/ g świeżej masy)	Wydajność znakowania**
GHCH-LiCl	3-4 dni*	0,1-140 μ g	0-20 %
GHCH-CsCl	3-4 dni*	0,1-240 μ g	10-20 %
GITC-PVP-LiCl	3-4 dni*	50 μ g	20 %***
RNeasy	30 min – 24h*	100-400 μ g	5-50 %

Tabela 10. Porównanie wydajności izolacji całkowitego RNA i znakowania ss cDNA przy zastosowaniu różnych metod izolacji.

* czas trwania izolacji był zależny od obecności lub braku dodatkowych etapów przetrącania, mających na celu zagęszczenie preparatów

** mierzona jako procent cząsteczek [α - 32 P]dCTP wbudowanych do cDNA w odniesieniu do całkowitej ilości izotopu użytej do znakowania

*** przeprowadzono tylko jedno próbne znakowanie

Kłopoty z wydajnością obserwowano również w przypadku poprzednich metod preparatyki RNA. Zastosowano zatem komercyjny zestaw do izolacji RNA, w którym po wstępnej lizie i denaturacji w buforze z izotiocyjanianem guanidyny, RNA jest wiązane i oczyszczane metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnkach z

silikonową membraną (metoda RNeasy). Pozwoliło to na szybką izolację RNA z bardzo dużą wydajnością, a w większości przypadków uzyskiwano także wysoki stopień wyznakowania cDNA (Tab. 10). Te czynniki zdecydowały, że w kolejnych eksperymentach izolowano RNA wyłącznie metodą RNeasy.

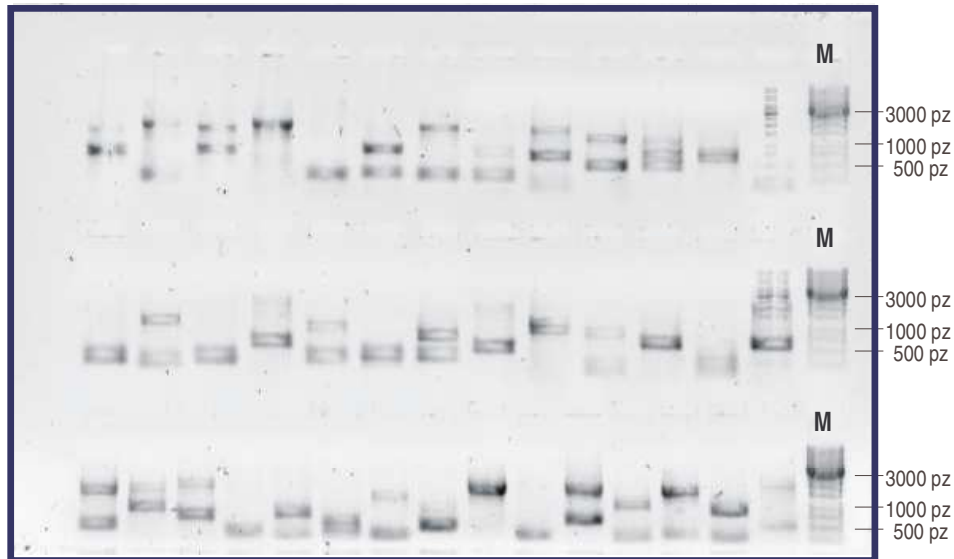
D.1.2. Etap I analizy różnicowej

Do wstępnego przeszukania znormalizowanej biblioteki cDNA zastosowano hybrydyzację kolonijną - około 5000 losowo wybranych rekombinantów przeniesiono na filtry nylonowe i poddano hybrydyzacji z próbą [A]. Po odmyciu niezwiązanego cDNA, ekspozycji i wizualizacji, porównywano układ sygnałów uzyskany dla poszczególnych filtrów z układem rekombinantów na wyjściowych szalkach. Dla ułatwienia tej analizy obrazy filtrów drukowano w oryginalnych rozmiarach na przezroczystych kliszach, a następnie przykładano do szalek na podświetlarce. Na tej podstawie wybierano „zimne klony”, tj. takie, dla których nie uzyskano sygnału po hybrydyzacji. Było ich około 2500. Wybór opierał się na założeniu, że reprezentują one geny o niskim poziomie ekspresji lub jej braku w niesymbiotycznych tkankach i mogą być wybiórczo zaangażowane w procesy związane z symbiozą.

D.1.3. Etap II analizy różnicowej

Grupa klonów wyselekcjonowanych we wstępnym przeszukaniu została poddana hybrydyzacji różnicowej z wykorzystaniem makromacierzy DNA o niskiej gęstości. Insety amplifikowano na matrycy plazmidowych DNA uwolnionych z analizowanych kolonii, stosując startery JP203 i JP204, komplementarne do sekwencji wektorowych otaczających insety. W pojedynczej reakcji amplifikacji używano po dwie matryce, otrzymując w ten sposób pary sond (Rys. 8). Pozwoliło to ograniczyć ich liczbę, a tym samym zmniejszyć rozmiar przygotowywanych filtrów nylonowych i objętość mieszaniny hybrydyzacyjnej.

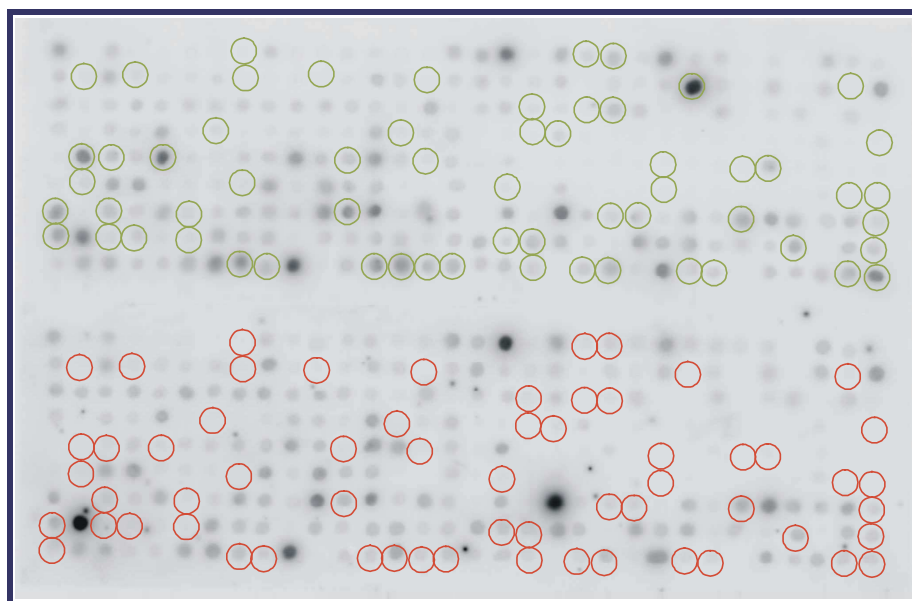
Produkty amplifikacji nanoszono na filtry nylonowe, przygotowując dwa identyczne zestawy makromacierzy DNA. Każdy zestaw hybrydyzowano odpowiednio z próbą [A]



Rysunek 8. Przykładowy obraz insertów uzyskanych przez amplifikację PCR klonów wybranych we wstępnym przeszukaniu znormalizowanej biblioteki cDNA. Matrycami w każdej reakcji były dwa różne klony cDNA. M – marker długości.

lub [B]. Obie próby były wyznakowane w zbliżonym stopniu: specyficzna aktywność próby [A] wynosiła 109×10^6 cpm (w kilku reakcjach znakowania użyto łącznie 115 μ g RNA), próby [B] – $90,6 \times 10^6$ cpm (do znakowania użyto łącznie 97,5 μ g RNA). Po zakończonej hybrydyzacji i ekspozycji przeprowadzono ilościową analizę intensywności sygnałów uzyskanych dla poszczególnych par sond. Na tej podstawie wyselekcjonowano klony o ekspresji indukowanej w brodawkach, w porównaniu z nieinfekowanymi korzeniami. Jako wartość graniczną przyjęto czterokrotnie wyższy poziom intensywności poszczególnych sygnałów (i) na filtrach [B] w stosunku do filtrów [A] ($Int_{Bi} / Int_{Ai} > 4$). Program Image Quant, który zastosowano do analizy ilościowej, oblicza intensywność sygnałów dla każdego obiektu na kilka sposobów. Do porównania wybrano dwa z nich. Wynik „Volume” informuje o sumie intensywności wszystkich pikseli w obiekcie, po odjęciu średniej wartości tła od każdego z nich. Z kolei wynik „Sum Above Background” podaje sumę intensywności tylko tych pikseli obiektu, dla których wartość ta jest dodatnia po odjęciu średniej intensywności tła. Ponieważ każda z metod dawała w rezultacie inne wyniki porównań dla poszczególnych sond, na tym etapie przeszukania zdecydowano się na selekcję wszystkich klonów, które spełniały przyjęty warunek $Int_{Bi} / Int_{Ai} > 4$ przynajmniej wg jednej z nich. Wyodrębniono w ten sposób 184 pary sond wykazujące podwyższony poziom ekspresji w korzeniach z brodawkami. Rozmieszczenie tych par na filtrach wskazuje, że uzyskane wartości nie są wynikiem błędów przy hybrydyzacji, takich jak

nierównomierne rozproszczenie buforu hbrzydacyjnego lub lokalne podwyższenie tła (Rys. 9).



Rysunek 9. Rozkład par sond wyselekcjonowanych na drugim etapie analizy różnicowej na odpowiadających sobie filtrach z poddanych hybrydyzacji zestawów. Okręgi wskazują położenie par sond wykazujących różnicową ekspresję: zielone - na filtrze hybrydyzowanym z próbą [B] pochodzącą z infekowanych korzeni, czerwone - na filtrze hybrydyzowanym z próbą [A] pochodzącą z korzeni kontrolnych.

D.1.4. Etap III analizy różnicowej

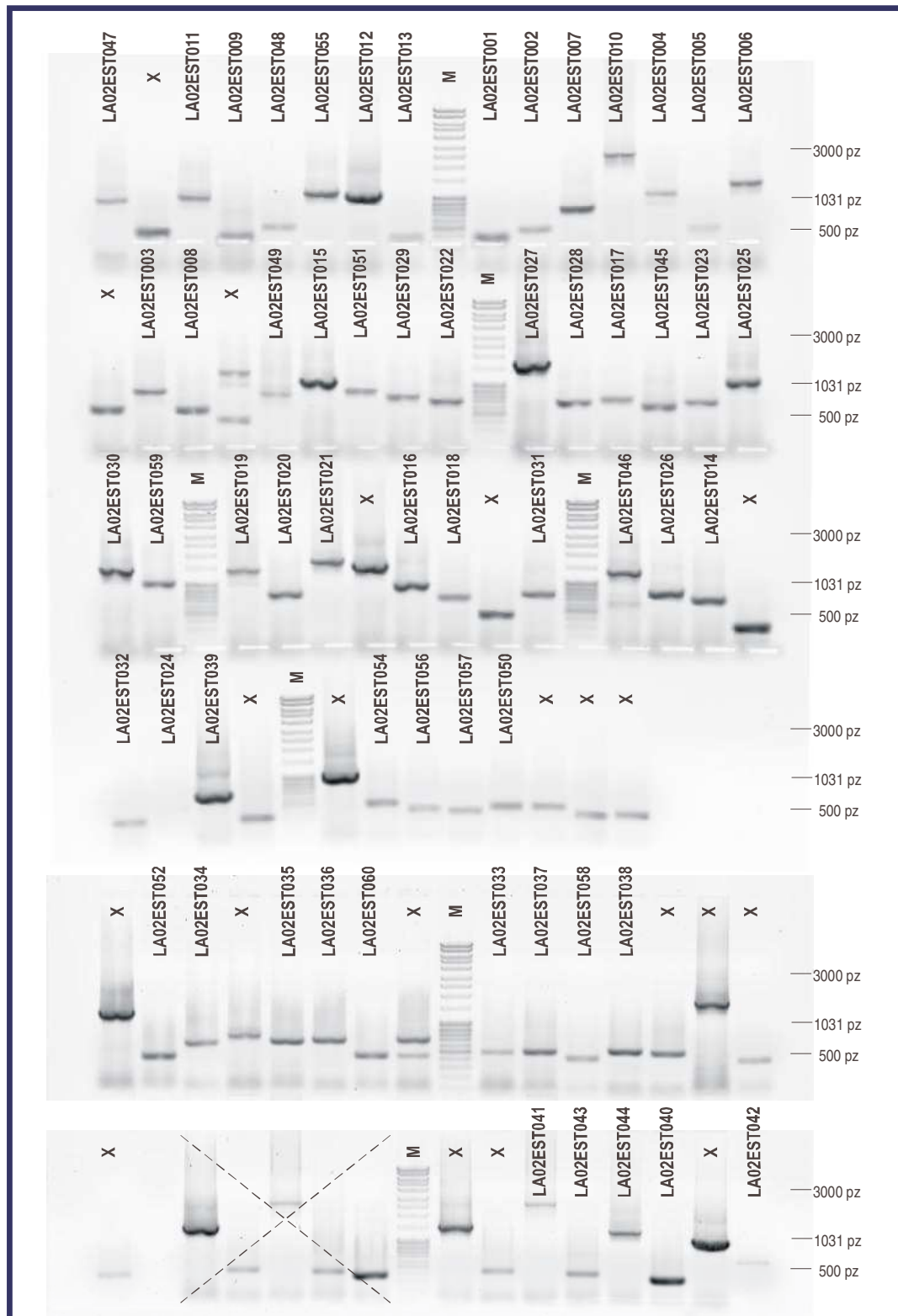
Kolejnym krokiem była indywidualna analiza ekspresji wyselekcjonowanych klonów cDNA. Przebiegała ona podobnie jak na etapie II, tym razem jednak każdą sondę przygotowano w niezależnej reakcji na matrycy poszczególnych plazmidów.

Ostatecznie amplifikowano 199 sond (54,6% klonów wyselekcjonowanych w fazie II), które naniesiono na filtry w dwóch powtórzeniach, w oddalonych od siebie pozycjach. Dwie identycznie przygotowane membrany hybrydyzowano z próbkami [A] i [B], każdą otrzymaną z 60 μg odpowiedniego RNA, o zbliżonej specyficznej aktywności (30×10^6 i 29×10^6 cpm). Po odmyciu i ekspozycji filtrów uzyskano obrazy, które poddano analizie ilościowej przy pomocy programu ImageQuant. Następnie wybrano te klony, dla których stosunek intensywności sygnałów wynosił $\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}} > 4$, wg metody „Volume” lub „Sum Above Background”. Było ich 55. Z kolei dla 35 innych klonów zaobserwowano znaczący spadek ekspresji w brodawkach w porównaniu z nieinfekowanymi korzeniami: $\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}} < 0,25$. Wynik ten mógł być zgodny z

wynikiem etapu II przeszukania w przypadku obserwowanej jednocześnie silnej indukcji drugiego genu z pary. Mogła ona zamaskować spadek ekspresji pierwszego genu. Potwierdziło się to dla pięciu klonów cDNA. W przypadku dalszych 24 klonów cDNA wykazujących na tym, ostatnim, etapie analizy różnicowej spadek ekspresji w brodawkach, wynik ten jest nieoczekiwany. Sondy, z którymi były one wcześniej sparowane, podczas analizy indywidualnej w III fazie przeszukania nie wykazały znaczącej zmiany ekspresji w brodawkach lub ich ekspresja również była obniżona. Dla pozostałych sześciu genów nie udało się sprawdzić ekspresji genów z pary, ponieważ nie były one analizowane na ostatnim etapie przeszukania. Mimo to wszystkie klony cDNA o stosunku sygnałów $\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}} < 0,25$ także użyto do dalszych badań.

D.1.5. Sekwencjonowanie insertów

W celu ustalenia fragmentów sekwencji wyselekcjonowanych klonów cDNA przeprowadzono jednokrotne reakcje sekwencjonowania dla każdego z nich. Inserty amplifikowano, używając starterów JP203 i JP204, i rozdzielano w żelu agarozowym. Jeśli obserwowano więcej niż jeden produkt amplifikacji, odpowiednie rekombinanty rozsiewano do pojedynczych kolonii na szalkach z zestaloną pożywką, amplifikowano inserty z 8 - 20 losowo wybranych kolonii i rozdzielano elektroforetycznie. W każdym z takich przypadków uzyskano pojedyncze prążki identycznej długości dla wszystkich sprawdzanych kolonii z danej serii i taki produkt – jako dominujący – dołączano do puli sekwencjonowanych insertów. Wszystkie amplikony oczyszczono i oszacowano ich stężenia przez powtórny rozdział elektroforetyczny (Rys. 10). Sekwencjonowanie przeprowadzono używając starter LAVecF. Uzyskiwano w ten sposób sekwencje końców 5' insertów. Otrzymane sekwencje poddawano obróbce, polegającej na usunięciu końcówek o niskiej jakości oraz pozostałości fragmentów wektorowych, które wyszukiwano ręcznie i przy pomocy programu VecScreen (NCBI). W czterdziestu czterech sekwencjach występował ciąg kilkunastu – kilkudziesięciu adenin, po których sekwencje stawały się nieczytelne. W takim przypadku sekwencje obcinano usuwając nukleotydy za czwartą adeniną segmentu poliadeninowego. Sekwencje całkowicie nieczytelne oraz takie, których długość po obróbce nie przekraczała 60 nt, odrzucono. Ostatecznie stworzono bibliotekę zawierającą pięćdziesiąt dziewięć sekwencji EST, którą nazwano ją LA02 (Rys. 10, Tab. 11). Trzydzieści siedem z nich



Rysunek 10. Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych produktów amplifikacji insertów z klonów wyselekcjonowanych w trakcie analizy różnicowej. Każdą linię opisano nazwą sekwencji EST otrzymanej w wyniku sekwencjonowania danego produktu. X - produkty, dla których nie otrzymano czytelnej sekwencji lub była ona krótsza niż 60 nt.; M – marker długości DNA.

reprezentowało klony o ekspresji podwyższonej w symbiozie (wg rezultatów III fazy analizy różnicowej), a pozostałe dwadzieścia dwa – klony o obniżonej ekspresji. Sekwencje EST zostały zdeponowane w bazie GenBank, pod numerami dostępu: DV468716 - DV468774. Zamieszczono je również w pliku tekstowym „LA02 sekwencje EST” na dołączonym do pracy dysku CD, w folderze „Biblioteka LA02”.

D.1.6. Przeszukanie baz danych

Sekwencje EST wykorzystano do wstępnego scharakteryzowania reprezentowanych przez nie genów przez porównanie ich z bazami danych białkowych oraz DNA, w poszukiwaniu sekwencji homologicznych. Jako pierwszą przeszukiwano bazę białkową *nr* za pośrednictwem serwera NCBI. Baza ta obejmuje wszystkie nie powtarzające się sekwencje utworzone w wyniku translacji cDNA zdeponowanych w GenBank-u oraz sekwencje białkowe z baz SwissProt, PDB, PIR i PRF. Podczas takiego przeszukania indywidualne sekwencje EST były tłumaczone na sekwencje aminokwasowe we wszystkich możliwych ramkach odczytu, a następnie porównywane z danymi z bazy, dzięki algorytmowi BlastX. W przypadku braku sekwencji białkowych o znaczącej homologii, sekwencje EST porównywano następnie z nukleotydową bazą *nr*, zawierającą wszystkie sekwencje DNA z GenBank-u, EMBL, DDBJ i PDB (z pominięciem sekwencji EST, STS, GSS i HTGS), przy użyciu algorytmu BlastN. Wykorzystując wyniki poszukiwania homologów dokonano adnotacji przypuszczalnej funkcji zidentyfikowanych genów (Tab. 11). Jeśli znajdowano istotne podobieństwo do szeregu różnorodnych sekwencji, przy adnotacji funkcjonalnej wykorzystywano wszystkie znalezione rekordy. Aż dla 28 sekwencji EST z biblioteki LA02 (ponad 47 %) poszukiwanie homologów w bazach białkowych nie dało rezultatów. Tylko 10 z nich udało się następnie zidentyfikować na podstawie podobieństwa do sekwencji DNA. Cztery sekwencje, LA02EST009, LA02EST048, LA02EST051 i LA02EST054, wykazały podobieństwo do cDNA leghemoglobin I i II z łubinu żółtego. Kolejne trzy były podobne do cDNA o nieprzypisanej funkcji, wcześniej znalezionych w genomowych sekwencjach roślinnych (LA02EST013, LA02EST033, LA02EST037). Dwa z nich wykazywały jednocześnie homologię do niekodujących RNA (7S RNA i U3 snRNA). Podobieństwo do snRNA wykazano także dla trzech innych sekwencji (LA02EST001, LA02EST002, LA02EST052). EST LA02EST056 reprezentuje najprawdopodobniej bakteryjny gen kodujący rybosomalny RNA 23S. Spośród

pozostałych 18 sekwencji, dla których nie znaleziono homologów w bazach danych, prawie wszystkie (z wyjątkiem LA02EST003) były zakończone ciągiem poli(A), a trzy czwarte z nich były bardzo krótkie – poniżej 250 nt.

Jako dopełnienie próby adnotacji funkcjonalnej genów na podstawie sekwencji EST, przeszukano nimi bazy roślinnych sekwencji nukleotydowych TIGR Gene Indices (TGI), stosując algorytm BlastN. Czterdzieści sekwencji EST wykazało znaczące podobieństwo do zdeponowanych w bazie DNA (Tab. 11). Zgodnie z przewidywaniami, w grupie tej znalazły się prawie wszystkie sekwencje, które wcześniej adnotowano na podstawie przeszukania baz białkowych. Wyjątkiem jest LA02EST015, który prawdopodobnie reprezentuje gen bakteryjny. Co ciekawe, dla pięciu sekwencji (LA02EST013, LA02EST018, LA02EST022, LA02EST029 i LA02EST042) przeszukanie roślinnych baz TGI zaowocowało odnalezieniem homologicznych sekwencji wyłącznie w roślinach motylkowatych. Tylko w jednym z tych przypadków (LA02EST022) wcześniejsze analizy wykazały podobieństwo także do białek roślin z innych rodzin (*A. thaliana* i *O. sativa*).

Pełne wyniki poszukiwania homologów dla poszczególnych sekwencji EST umieszczono na dysku CD w folderze „Biblioteka LA02”.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych	Homologi TGI
LA02EST001	DV468716	100	+	-	U1 snRNA	+
LA02EST002	DV468717	177	+	-	U2 snRNA	+
LA02EST003	DV468718	579	-	-	-	-
LA02EST004	DV468719	136	+	-	-	-
LA02EST005	DV468720	136	+	-	-	-
LA02EST006	DV468721	764	-	subtilisin-like serine protease	x	+
LA02EST007	DV468722	513	+	unknown / putative glutamine synthetase / hydrolase	x	+
LA02EST008	DV468723	281	+	ribosomal protein L41	x	+
LA02EST009	DV468724	99	+	-	leghemoglobin	-
LA02EST010	DV468725	721	-	unnamed / putative zinc finger protein	x	+
LA02EST011	DV468726	683	+	hypothetical / membrane associated protein	x	+
LA02EST012	DV468727	759	-	beta (1,2)-xylosyltransferase	x	+
LA02EST013	DV468728	69	+	-	sekwencja genomowa <i>M. truncatula</i>	leg
LA02EST014	DV468729	419	+	unknown	x	+

Tabela 11. Biblioteka LA02 sekwencji EST uzyskanych przez częściowe sekwencjonowanie klonów wybranych w trzyetapowym przeszukaniu znormalizowanej biblioteki DNA. Kolorem zielonym oznaczono te klony, dla których na trzecim etapie analizy różnicowej wykazano indukcję ekspresji w brodawkach. Kolorem czerwonym oznaczono klony wykazujące obniżoną ekspresję. „leg” – homologi znaleziono wyłącznie wśród sekwencji z roślin motylkowatych.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciagu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych	Homologi TGI
LA02EST015	DV468730	768	-	hypothetical / predicted HD phosphohydrolase (sekwencje bakteryjne)	x	-
LA02EST016	DV468731	666	-	unknown	x	+
LA02EST017	DV468732	471	+	unknown / lipid transfer protein	x	+
LA02EST018	DV468733	446	+	-	-	leg
LA02EST019	DV468734	638	-	unnamed / ethylene response factor / DRE binding factor	x	+
LA02EST020	DV468735	502	+	UDP glucuronate decarboxylase	x	+
LA02EST021	DV468736	656	-	lipase class 3 protein-like	x	+
LA02EST022	DV468737	437	+	putative	x	leg
LA02EST023	DV468738	411	+	unnamed	x	+
LA02EST024	DV468739	211	+	-	-	-
LA02EST025	DV468740	730	+	unknown	x	+
LA02EST026	DV468741	554	+	actin polymerization factor	x	+
LA02EST027	DV468742	775	-	unknown / Shwachman-Bodian-Diamond syndrome homolog	x	+
LA02EST028	DV468743	409	+	unknown / ENOD18 / stress responsive / ethylene responsive /CHP-rich zinc finger protein	x	+
LA02EST029	DV468744	516	+	-	-	leg

Tabela 11. Biblioteka LA02 cd.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciagu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych	Homologi TGI
LA02EST030	DV468745	707	-	protein kinase	x	+
LA02EST031	DV468746	510	+	cysteine proteinase inhibitor	x	+
LA02EST032	DV468747	63	+	-	-	-
LA02EST033	DV468748	202	+	-	roślinne sekwencje genomowe / U3 snRNA	-
LA02EST034	DV468749	357	+	unknown	x	+
LA02EST035	DV468750	383	+	ABC transporter	x	+
LA02EST036	DV468751	338	+	unknown / ring box protein	x	+
LA02EST037	DV468752	200	+	-	roślinne sekwencje genomowe / small cytoplasmic RNA 7S	+
LA02EST038	DV468753	247	+	-	-	-
LA02EST039	DV468754	92	+	-	-	-
LA02EST040	DV468755	94	+	-	-	-
LA02EST041	DV468756	723	-	Cell division protein / ATP-ase / ATP-dependent metalloprotease	x	+
LA02EST042	DV468757	433	+	-	-	leg
LA02EST043	DV468758	131	+	-	-	-
LA02EST044	DV468759	695	-	phosphoinositide phospholipase C	x	+

Tabela 11. Biblioteka LA02 cd.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych	Homologi TGI
LA02EST045	DV468760	338	+	-	-	+
LA02EST046	DV468761	752	-	leucine rich repeat receptor-like kinase	x	+
LA02EST047	DV468762	629	+	late embryogenesis protein / IAA-induced protein ARG2 homolog	x	+
LA02EST048	DV468763	228	+	-	leghemoglobin	-
LA02EST049	DV468764	508	+	-	-	-
LA02EST050	DV468765	574	-	nodulin-26 / aquaporin	x	+
LA02EST051	DV468766	629	+	leghemoglobin	x	+
LA02EST052	DV468767	150	+	-	U2 snRNA	+
LA02EST054	DV468768	235	+	-	leghemoglobin	-
LA02EST055	DV468769	774	-	subtilisin-like serine protease	x	+
LA02EST056	DV468770	161	+	-	23S ribosomal RNA (sekwencja bakteryjna)	+
LA02EST057	DV468771	115	+	-	-	-
LA02EST058	DV468772	114	+	-	-	-
LA02EST059	DV468773	783	+	-	-	-
LA02EST060	DV468774	166	+	-	-	-

Tabela 11. Biblioteka LA02 cd.

D.2. Otrzymanie cDNA reprezentujących geny markerowe

Równoległym zadaniem było przygotowanie zestawu klonów cDNA, które miałyby posłużyć w planowanych analizach ekspresji jako markery wybranych procesów i szlaków metabolicznych. Założono, że wśród tych markerów powinny znaleźć się:

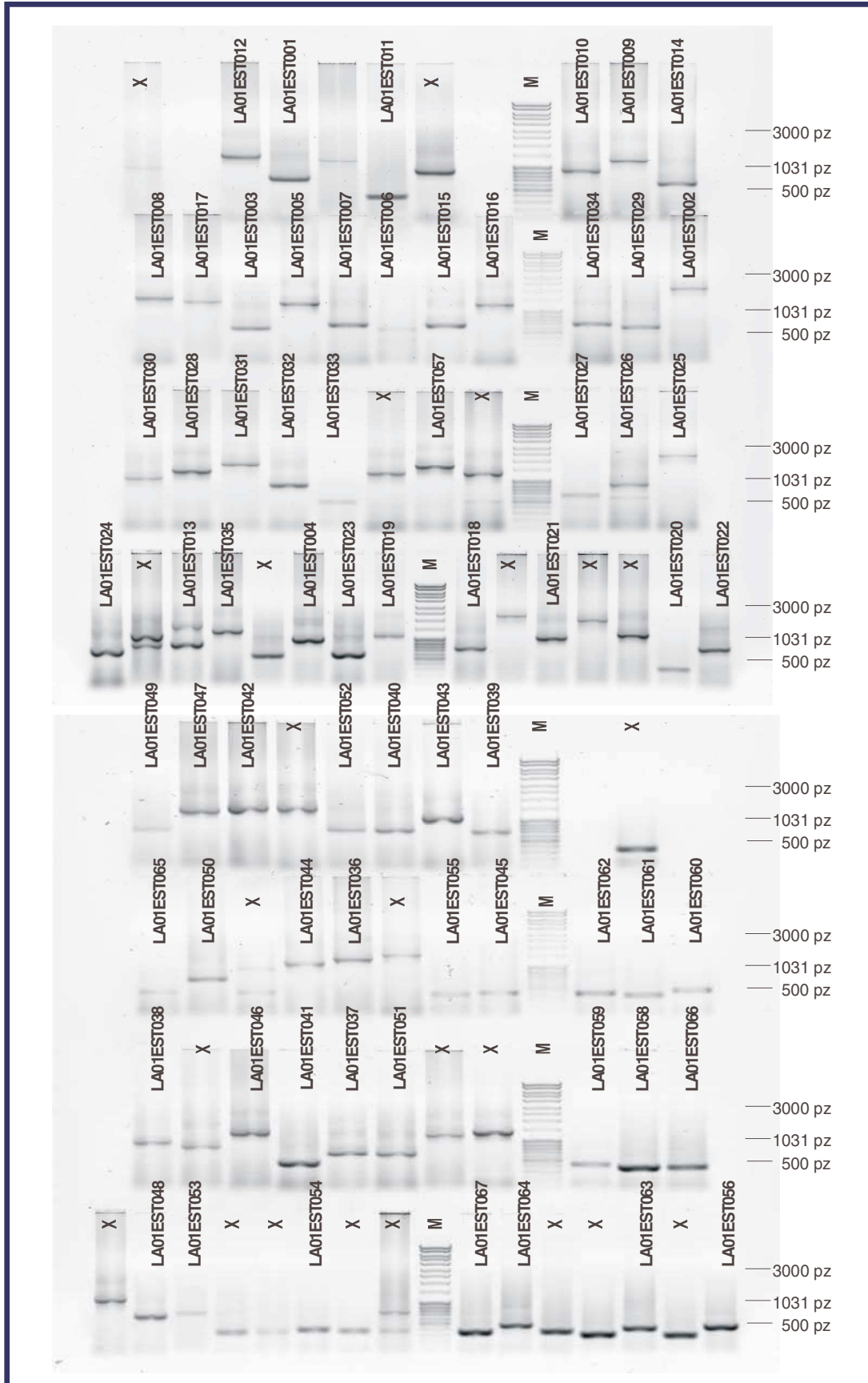
- geny metabolizmu podstawowego, o konstytutywnej ekspresji w symbiozie,
- geny zaangażowane w metabolizm węgla i azotu w brodawkach korzeniowych,
- geny znanych nodulin o udokumentowanym profilu ekspresji w symbiozie,
- geny związane ze szlakiem transdukcji sygnałów w symbiozie,
- geny zaangażowane w sygnalizację hormonalną,
- geny odpowiedzi obronnych rośliny.

W celu zebrania puli markerów zastosowano dwa niezależne podejścia. Jednym z nich było częściowe sekwencjonowanie klonów cDNA losowo wybranych ze znormalizowanej biblioteki cDNA. Jako podejście drugie – uzupełniające – zaplanowano amplifikację i klonowanie wybranych cDNA w oparciu o znane sekwencje genów z innych roślin motylkowatych.

D.2.1. Losowy wybór klonów ze znormalizowanej biblioteki cDNA

Ze znormalizowanej biblioteki cDNA wybrano losowo 96 rekombinantów. Insety amplifikowano używając starterów JP203 i JP204, oczyszczono i zmierzono stężenie produktów przez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (Rys. 11). Następnie poddano je pojedynczej reakcji sekwencjonowania od strony końca 5', stosując starter LaVecF, a otrzymane sekwencje obrabiano w podobny sposób jak sekwencje LA02. W rezultacie otrzymano 67 sekwencji EST o długości od 63 do 753 nt, które utworzyły bibliotekę LA01. Otrzymane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank, pod numerami dostępu DV468649 - DV468715.

Sekwencje EST wykorzystano do przeszukania białkowych i nukleotydowych baz



Rysunek 11. Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych produktów amplifikacji insertów z losowo wybranych klonów. Każdą linię opisano nazwą sekwencji EST otrzymanej w wyniku sekwencjonowania danego produktu. X. - produkty, dla których nie otrzymano czytelnej sekwencji lub była ona krótsza niż 60 nt; M – marker długości DNA.

danych. W rezultacie adnotowano czterdzieści pięć genów, z czego pięć zidentyfikowano jako geny kodujące białka nieznane lub przypuszczalne (Tab 12). Kolejne pięć to geny białek rybosomalnych, (LA01EST006, LA01EST007, LA01EST022, LA01EST023, LA01EST032). Kilka innych prawdopodobnie koduje czynniki transkrypcyjne (np. LA01EST002, LA01EST018, LA01EST028, LA02EST030), białka indukowane w obecności określonych czynników (LA01EST013, LA01EST050) czy białka, które mogą być związane z reakcjami obronnymi rośliny (LA01EST017). Na końcach 3' czternastu spośród dwudziestu dwóch nieadnotowanych sekwencji znajdowały się ciągi kilkunastu – dwudziestu kilku adenin, prawdopodobnie reprezentujące łańcuchy poli(A). Piętnaście z nieadnotowanych sekwencji miało długość poniżej 400 nt.

Sekwencje LA01 oraz wynikowe pliki przeszukiwań baz danych zamieszczono w folderze „Biblioteka LA01” na dysku CD dołączonym do pracy.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych
LA01EST001	DV468649	416	+	unknown	x
LA01EST002	DV468650	612	-	heat shock transcription factor	x
LA01EST003	DV468651	285	+	-	-
LA01EST004	DV468652	434	-	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase	x
LA01EST005	DV468653	510	-	high mobility group protein HMG-1	x
LA01EST006	DV468654	396	-	-	acidic ribosomal protein 60S
LA01EST007	DV468655	423	+	40S ribosomal protein S28	x
LA01EST008	DV468656	592	-	xyloglucan endotransglycosylase	x
LA01EST009	DV468657	753	-	-	-
LA01EST010	DV468658	657	+	unknown	x
LA01EST011	DV468659	91	+	-	-
LA01EST012	DV468660	706	-	chloride channel protein	x
LA01EST013	DV468661	597	+	nitrate-induced protein / unknown	x
LA01EST014	DV468662	372	+	-	-

Tabela 12. Biblioteka LA01 sekwencji EST uzyskanych w wyniku jednokrotnego sekwencjonowania klonów losowo wybranych ze znormalizowanej biblioteki cDNA.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych
LA01EST015	DV468663	217	-	cyclophilin	x
LA01EST016	DV468664	243	-	aconitase	x
LA01EST017	DV468665	535	-	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	x
LA01EST018	DV468666	488	+	putative / WD-40 repeat family protein	x
LA01EST019	DV468667	693	-	-	hydroxyproline rich protein / extensin
LA01EST020	DV468668	68	-	-	ferredoxin:sulfite reductase precursor
LA01EST021	DV468669	691	-	U6 snRNA-associated Sm-like protein	x
LA01EST022	DV468670	246	+	60S ribosomal protein L39	x
LA01EST023	DV468671	318	+	60S ribosomal protein L27	x
LA01EST024	DV468672	457	+	thioredoxin H-type	x
LA01EST025	DV468673	372	-	-	-
LA01EST026	DV468674	579	-	-	-
LA01EST027	DV468675	370	+	transcription factor BTF3	x
LA01EST028	DV468676	465	-	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein / unknown	x
LA01EST029	DV468677	316	+	-	-

Tabela 12. Biblioteka LA01 cd.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych
LA01EST030	DV468678	312	-	putative transcription regulatory protein	x
LA01EST031	DV468679	697	-	auxin-induced protein / putative membrane protein	x
LA01EST032	DV468680	537	-	60S ribosomal protein L24	x
LA01EST033	DV468681	254	-	rhodanese-like domain protein / unknown	x
LA01EST034	DV468682	466	-	glycine hydroxymethyltransferase / serine hydroxymethyltransferase	x
LA01EST035	DV468683	734	-	voltage-dependent anion channel	x
LA01EST036	DV468684	711	-	serine-rich protein / unknown	x
LA01EST037	DV468685	343	-	unknown / putative protein	x
LA01EST038	DV468686	520	-	serine/threonine protein phosphatase	x
LA01EST039	DV468687	402	+	-	-
LA01EST040	DV468688	466	+	-	sekwencja genomowa <i>L. japonicus</i>
LA01EST041	DV468689	207	-	-	-
LA01EST042	DV468690	660	-	putative protein	x
LA01EST043	DV468691	706	-	-	-
LA01EST044	DV468692	353	-	fiber NTGP1-related protein / ATGP1-like protein	x

Tabela 12. Biblioteka LA01 cd.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych
LA01EST045	DV468693	129	+	-	hydroxyproline rich glycoprotein / extensin
LA01EST046	DV468694	554	-	-	-
LA01EST047	DV468695	719	-	-	-
LA01EST048	DV468696	397	+	-	-
LA01EST049	DV468697	366	+	-	-
LA01EST050	DV468698	416	+	phi-1 phosphate-induced protein	x
LA01EST051	DV468699	370	+	-	-
LA01EST052	DV468700	438	+	putative G-box binding protein / B12D	x
LA01EST053	DV468701	410	-	-	-
LA01EST054	DV468702	96	+	-	bakteryjne sekwencje genomowe
LA01EST055	DV468703	74	+	-	-
LA01EST056	DV468704	135	+	-	bakteryjne sekwencje genomowe
LA01EST057	DV468705	527	-	protein kinase	x
LA01EST058	DV468706	87	+	-	-
LA01EST059	DV468707	219	-	ring finger protein / ubiquitin--protein ligase	x

Tabela 12. Biblioteka LA01 cd.

EST	Numer dostępu GenBank-u	Długość po obróbce	Obecność ciągu poli(A)	Homologi w bazach sekwencji białkowych	Homologi w bazach sekwencji nukleotydowych
LA01EST060	DV468708	139	+	hypothetical protein	x
LA01EST061	DV468709	82	+	-	U3 snRNA / roślinne sekwencje genomowe
LA01EST062	DV468710	101	+	-	5.8S RNA and ITS2
LA01EST063	DV468711	108	+	-	-
LA01EST064	DV468712	148	+	-	U2 snRNA
LA01EST065	DV468713	134	+	-	-
LA01EST066	DV468714	72	+	-	-
LA01EST067	DV468715	65	+	-	-

Tabela 12. Biblioteka LA01 cd.

D.2.2. Amplifikacja RT PCR w oparciu o dane sekwencyjne genów z innych roślin

Na podstawie dostępnych w literaturze danych sporządzono listę genów, które mogłyby służyć jako markery w zaplanowanych doświadczeniach. Dla każdego genu z listy wyszukiwano w bazach danych dostępne roślinne sekwencje cDNA i analizowano ich podobieństwo, używając programu ClustalW. Na podstawie sporządzonego porównania projektowano startery do amplifikacji, poszukując regionów sekwencji wystarczająco zachowawczych dla zaprojektowania efektywnych starterów, a jednocześnie możliwie specyficznych dla cDNA z roślin motylkowatych, czy też cDNA brodawkowo specyficznych izoform (Tab. 13).

Wybrany gen	Sekwencje źródłowe - organizm i nr dostępu w bazie danych	Zaprojektowane specyficzne startery
METABOLIZM WĘGLA I AZOTU		
aminotransferaza asparagianu (AAT)	<i>L. angustifolius</i> (X59761.1; M92094.1)	LA002
syntetaza asparaginy (AS)	<i>M. sativa</i> (U89923.1), <i>L. japonicus</i> (X89410.1; X89409.1), <i>P. sativum</i> (X52179.1), <i>V. faba</i> (Z72354.1), <i>G. max</i> (U77679.1), <i>P. vulgaris</i> (AJ009952.1; AJ133522.1), <i>Z. mays</i> (X82849.1)	LA001
urykaza (podj. Nod -35)	<i>M. sativa</i> (AB028149.1), <i>G. max</i> (D86930.1; AB002810.1), <i>P. vulgaris</i> (U72663.1), <i>V. aconitifolia</i> (M92435.1)	LA008
syntetaza glutaminy (GS)	<i>L. angustifolius</i> (X15578.1), <i>M. truncatula</i> (Y10268.1), <i>P. vulgaris</i> (X14605.1; X04001.1), <i>G. max</i> (X81700.1, X81460.1; S46513.1), <i>L. japonicus</i> (X94299.1), <i>V. aconitifolia</i> (M94765.1), <i>M. sativa</i> (V15591)	LA003; Lang_GS_FORWARD_1_
syntaza glutaminianowa NADH-zależna (GOGAT)	<i>P. vulgaris</i> (AF314924.1; AF314925.1), <i>M. sativa</i> (L37606.1), <i>O. sativa</i> (AB008845.1)	LA004
enolaza	<i>L. esculentum</i> (S48722.1), <i>Z. mays</i> (U17973.1), <i>S. oleracea</i> (AJ271719.1), <i>R. communis</i> (Z28386.1)	LA007
karboksylaza fosfoenolopirogronianu (PEPC)	<i>M. sativa</i> (M83086.1; L39371.1), <i>V. faba</i> (AJ011302.1), <i>G. max</i> (D13998.1; AB008540.1), <i>P. sativum</i> (D64037.1), <i>Z. mays</i> (AB012228.1)	LA005; M_PEPC_002

Tabela 13. Lista sekwencji źródłowych użytych do zaprojektowania starterów do amplifikacji fragmentów cDNA genów markerowych z łubinu

syntaza sacharozy (SUCS)	<i>P. sativum</i> (X98598.1), <i>V. faba</i> (X69773.1), <i>M. sativa</i> (AF049487.1), <i>M. truncatula</i> (AJ131943.1), <i>P. vulgaris</i> (AF315375.1), <i>G. max</i> (AF030231.1)	LA006
dehydrogenaza jablczanowa	<i>M. sativa</i> (AF020273.1), <i>P. sativum</i> (AF079850.1), <i>G. max</i> (AF068686.3), <i>M. truncatula</i> (F461200.1), <i>A. thaliana</i> (NM_114620.2), <i>N. tabacum</i> (AJ006974.1),	LA010F
GENY O KONSTYTUTYWNEJ EKSPRESJI		
aktyna	<i>V. radiata</i> (AF143208.1), <i>P. sativum</i> (U76192.1; U76191.1; U76190.1; U81048.1; U81046.1; U81047.1), <i>G. max</i> (U60497.1; U60499.1)	M_ACTIN_007
NODULINY		
ENOD5	<i>T. repens</i> (AJ310340.1), <i>V. faba</i> (AJ250498.1; AJ250497.1), <i>P. sativum</i> (S45139.1), <i>V. sativa</i> (X83681.1)	LA101
ENOD7	<i>P. sativum</i> (X93172.1), <i>V. faba</i> (Z81320.1; Z81319.1)	LA102
ENOD12	<i>P. sativum</i> (M60585.1), <i>M. truncatula</i> (X68032.1), <i>M. sativa</i> (X67507.1; X74356.1; X74355.1), <i>V. faba</i> (AJ277289.1)	LA103
ENOD40	<i>L. luteus</i> (AF352375.1; AF352374.1), <i>G. max</i> (X69154.1)	M10_E40F; M11_E40R
nodulina-26	<i>G. max</i> (M94764.1), <i>M. truncatula</i> (AY059381.1) <i>L. japonicus</i> (AF275316.1)	LA106
nodulina -45	<i>L. angustifolius</i> (Z12820.1), <i>L. luteus</i> (X77044.1)	LA107
SYGNALIZACJA HORMONALNA I REAKCJE OBRONNE		
AUX/IAA	<i>G. max</i> (AF169830.1), <i>P. tremula</i> x <i>P. tremuloides</i> (AJ306829.1), <i>A. thaliana</i> (U18416.1; U18409.1), <i>N. tabacum</i> (AF123508.1)	LA203
syntaza chalkonowa (CHS)	<i>M. sativa</i> (L02903.1; U01021.1), <i>G. max</i> (M98871.1), <i>P. sativum</i> (D88262.1)	LA303
alfa-dioxygenaza / feebly	<i>L. luteus</i> (BG154076.1), <i>N. attenuata</i> (AF229926.1), <i>N. tabacum</i> (AJ007630.1), <i>C. annuum</i> (AY040869.1), <i>A. thaliana</i> (AY064666.1)	LA302
SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU INICJOWANY PRZEZ CZYNNIK NOD		
lektyna o właściwościach apyrazy	<i>D. biflorus</i> (AF139807.1), <i>L. japonicus</i> (AF156780.1), <i>M. sativa</i> (AF156782.1), <i>M. truncatula</i> (AF288132.1)	LA201
NFR1	<i>L. japonicus</i> (AJ575249.1; AJ575248.1), <i>M. truncatula</i> (AY372406.1; AY372420.1; AY372401.1; AY372424.1; AY372404.1)	LA208F; LA209F; LA214R; LA219R; F1NFR1; R1NFR1
NFR5	<i>L. japonicus</i> (AJ575254.1), <i>P. sativum</i> (AJ575250.1)	LA215F; LA217R
SYMRK	<i>L. japonicus</i> (AAM67418.1), <i>V. hirsuta</i> (CAD22012.1), <i>P. sativum</i> (AAM76684.1), <i>M. truncatula</i> (AAM76685.1), <i>M. sativa</i> (AD10807.1)	LA205F; LA207R

Tabela 13. Lista sekwencji źródłowych cd.

Matrycami w reakcji amplifikacji były:

1 - znormalizowany ss cDNA, taki sam jak użyty do przygotowania znormalizowanej biblioteki cDNA (por. punkt C.1.1.5). Przy amplifikacji stosowano specyficzny dla konkretnej sekwencji starter F oraz uniwersalny starter LAVecR;

2 - ss cDNA syntetyzowany z RNA z infekowanych korzeni łubinu (mieszanina kilku stadiów po infekcji) w reakcji odwrotnej transkrypcji, z udziałem uniwersalnego startera JP207. Starter ten jest komplementarny do łańcucha poli(A) mRNA i zawiera odcinek adapterowy na końcu 5'. Do amplifikacji konkretnej sekwencji używano następnie niespecyficznego startera JP205, komplementarnego do odcinka adapterowego oraz specyficznego startera F;

3 - ss cDNA, przygotowany z RNA z infekowanych (mieszanina kilku stadiów po infekcji) lub nieinfekowanych korzeni łubinu. Do odwrotnej transkrypcji używano specyficznego startera R, przygotowany na podstawie znanych sekwencji danego genu. Amplifikację prowadzono wówczas przy użyciu dwóch specyficznych starterów, F i R.

Dla większości genów projektowano tylko specyficzny starter F, komplementarny do takiego miejsca, aby po amplifikacji otrzymać fragment cDNA kodujący kilkadziesiąt – sto kilkadziesiąt aminokwasów z końca C białka oraz region 3' UTR. W przypadku *NFRI*, *NFR5* i *SYMRK* użyto pary specyficznych starterów F i R, zaprojektowanych w taki sposób, aby amplifikować duże fragmenty sekwencji kodujących, bez regionu 3' UTR. Dwa specyficzne startery wykorzystano również do uzyskania konserwatywnego fragmentu cDNA genu *ENOD40*, zawierającego zachowawczą otwartą ramkę odczytu ORF II. Produkty PCR o spodziewanej długości (szacowanej na podstawie sekwencji użytych do projektowania starterów) wycinano z żelu i oczyszczano. W przypadku uzyskania szeregu produktów o różnych długościach i braku wyróżniającego się prążka po elektroforezie, przeprowadzano powtórny amplifikację na matrycy produktów z pierwszej reakcji PCR i powtórnie oczyszczano. Następnie fragmenty cDNA klonowano do wektora pCR2.1, transformowano nimi komórki *E. coli* i przeprowadzano selekcję zrekombinowanych kolonii. Uzyskanie fragmentużądanego cDNA potwierdzano sekwencjonując inserty z wyizolowanych plazmidów i porównując z sekwencjami w bazach białkowych lub nukleotydowych oraz przeszukując bazy domen białkowych CDD (NCBI).

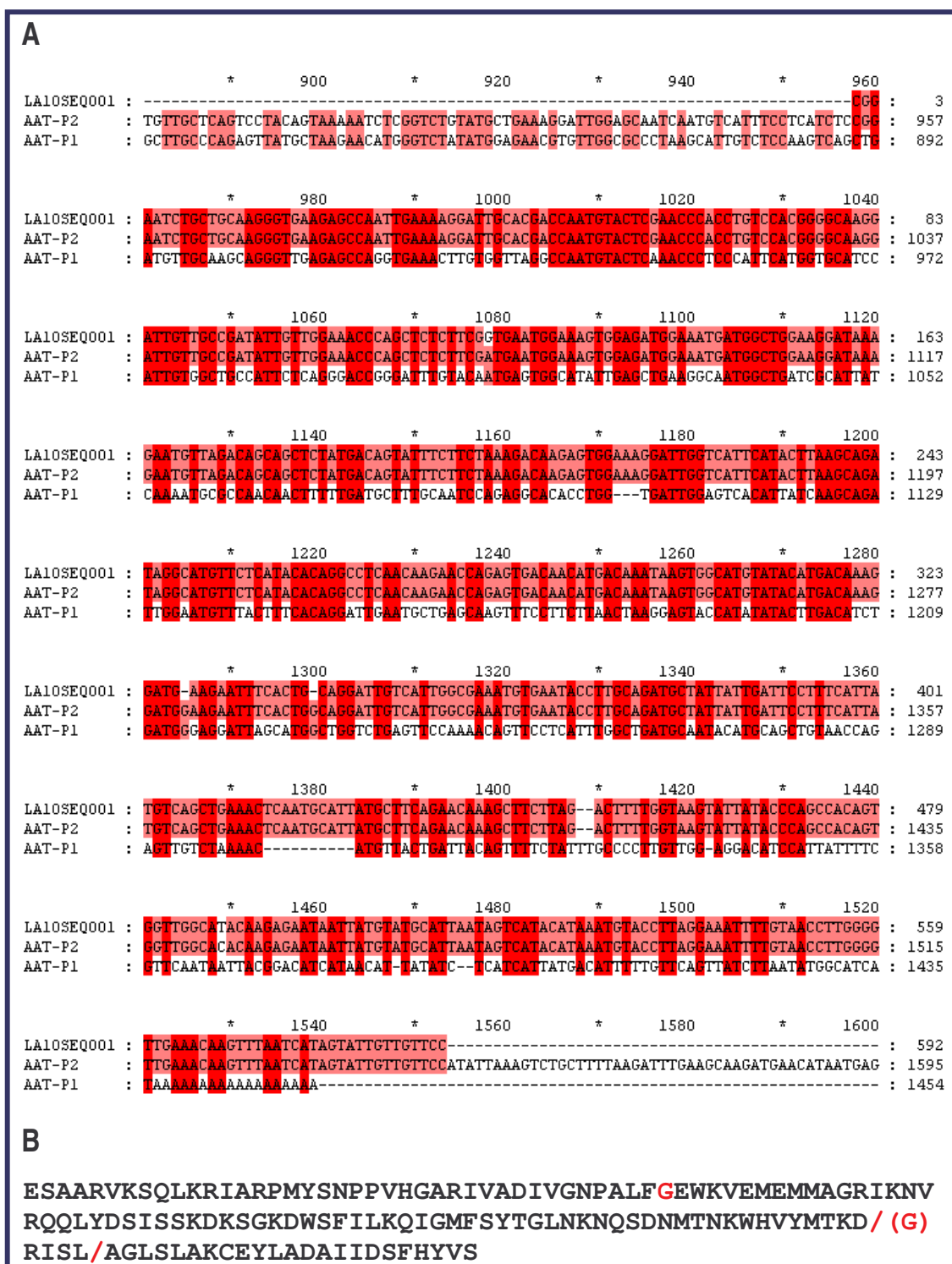
Klon	Adnotacja funkcjonalna	matryca do amplifikacji	Starter 5'	Starter 3'	Dł. sklonowanego fragmentu	Dł. sekwencji kodującej	Dł. regionu 3' UTR
LA10SEQ001	AAT – aminotransferaza asparaginianu	1	LA002	LAVecR	592 nt	136 aa	181 nt
LA10SEQ002	AS – syntetaza asparaginy	1	LA001	LAVecR	467 nt	112 aa	145 nt
LA10SEQ003	Urykaza (podj. Nod –35)	1	LA008	LAVecR	407 nt	41 aa	281 nt
LA10SEQ004	GS – syntetaza glutaminy	2	Lang_GS_FORWARD_1_	JP205	726 nt	153 aa	266 nt
LA10SEQ020	Enolaza	1	LA007	LAVecR	355 nt	52 aa	196 nt
LA10SEQ021	PEPC – karboksylaza fosfoenolopirogronianu	2	M_PEPC_002	JP205	655 nt	191 aa	78 nt
LA10SEQ022	SUCS – syntaza sacharozy	1	LA006	LaVecR	406 nt	54 aa	241 nt
LA10SEQ040	ENOD40	3 (inf.)	M10_E40F	M11_E40R	365 nt	ND	
LA10SEQ041	Nodulina -45	2	LA107	JP205	437 nt	55 aa	269 nt
LA10SEQ042	Nodulina-26	1	LA106	LAVecR	622 nt	112 aa	283 nt
LA10SEQ064	Aktyna	2	M_ACTIN_007	JP205	688 nt	166 aa	187 nt
LA10SEQ080	AUX/IAA	1	LA203	LAVecR	326 nt	40 aa	203 nt
LA10SEQ081	CHS – syntaza chalkonowa	1	LA303	LAVecR	~500 nt	80 aa	>136 nt
LA10SEQ082	alfa-dioksygenaza / feebly	1	LA302	LAVecR	496 nt	127 aa	112 nt
LA10SEQ090	NFR5	3 (nieinf.)	LA215F	LA217R	923 nt	307 aa	x
LA10SEQ091	SYMRK	3 (nieinf.)	LA205F	LA207R	2571 nt	857 aa	x

Tabela 14. Biblioteka LA10 fragmentów cDNA genów markerowych, uzyskanych przez klonowanie na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych.

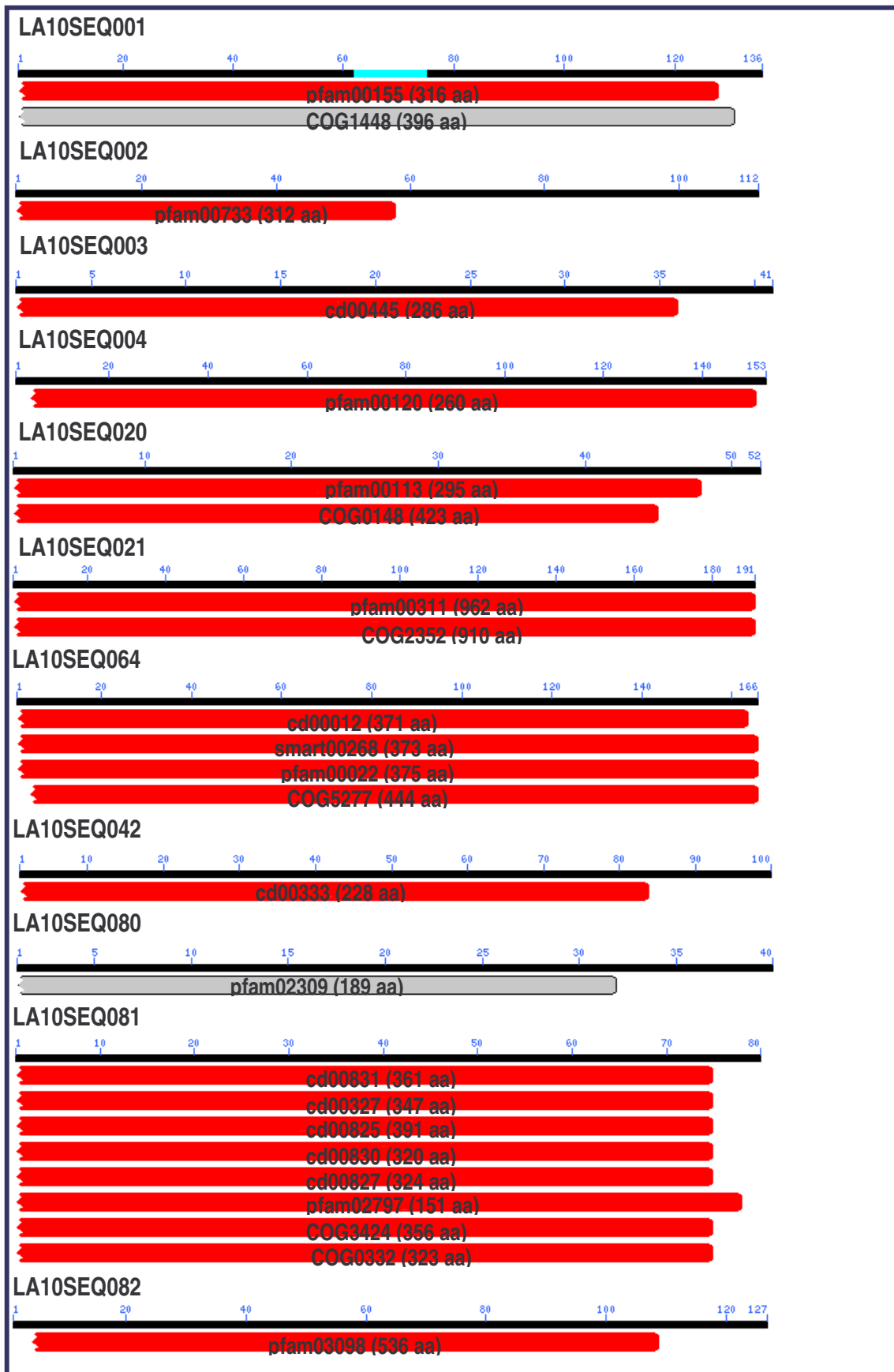
Spośród wybranych do klonowania genów zaangażowanych w różnorodne procesy fizjologiczne w roślinie, amplifikowano z powodzeniem szesnaście (Tab. 14). Utworzyły one bibliotekę LA10. Sekwencje uzyskanych markerów oraz wyniki porównań tych sekwencji z bazami danych zamieszczono na dysku CD dołączonym do pracy, w folderze „Biblioteka LA10”.

D.2.2.1. Markery metabolizmu węgla i azotu

Najliczniejszą grupę zaplanowanych do amplifikacji markerów stanowiły geny metabolizmu węgla i azotu – najlepiej poznanego procesu metabolicznego zachodzącego w symbiotycznych brodawkach. Udało się amplifikować siedem spośród dziewięciu wybranych sekwencji. Sekwencja LA10SEQ001 wykazała bardzo wysokie podobieństwo do roślinnych aminotransferaz asparaginianu, a największe - do AAT-P2 z łubinu wąskolistnego. AAT-P2 to izoforma specyficznie występująca w plastydach symbiotycznych brodawek łubinowych [Reynolds i Farnden 1979; Reynolds i wsp. 1992]. Wykazano, że ekspresja genu kodującego AAT-P2 w brodawkach jest indukowana w tym samym czasie, kiedy rozpoczyna się symbiotyczne wiązanie azotu. W zainfekowanych korzeniach łubinu wąskolistnego wykryto także obecność innej izoformy aminotransferazy asparaginianu, AAT-P1 [Reynolds i Farnden 1979]. Mimo że AAT-P1 dominuje w brodawkach (odpowiada za 60 % specyficznej aktywności tego enzymu), to poziom białka AAT-P1 nie zmienia się w czasie ich rozwoju - w przeciwieństwie do indukowanej ekspresji AAT-P2 [Winefield i wsp. 1994]. Sekwencja markera LA10SEQ001 jest zdecydowanie różna od AAT-P1, a tylko w trzech pozycjach różni się od sekwencji AAT-P2 (jedna transycja i dwie delecje nukleotydowe; Rys. 12A). Pociąga to za sobą zmiany w sekwencji aminokwasowej (Rys. 12B). W dedukowanej sekwencji białka (po uwzględnieniu przesunięć ramki odczytu) można zidentyfikować fragment domeny aminotransferazy (Rys. 13). Marker LA10SEQ001 jest zatem fragmentem cDNA brodawkowo – specyficznej izoformy aminotransferazy asparaginianu AAT-P2. Obserwowane różnice w sekwencji wynikają, jak się wydaje, z błędów wprowadzonych przez polimerazę w trakcie amplifikacji markera.



Rysunek 12. Sekwencja markera LA10SEQ001. A Porównanie z sekwencjami cDNA AAT-P1 (M92094) i AAT-P2 (X59761). **b)** Przewidywana sekwencja aminokwasowa, ustalona w oparciu o sekwencję białka AAT-P2. Kolorem czerwonym zaznaczono różnice w sekwencjach wynikające z mutacji sekwencji podczas amplifikacji markera. / - miejsce zmiany ramki odczytu.



Rysunek 13. Wyniki przeszukania bazy CDD aminokwasowymi sekwencjami markerów. Niebieska podziałka obrazuje sekwencję markera. Na znalezione fragmenty domen (zaznaczone kolorami szarym i czerwonym) naniesiono ich numery identyfikacyjne oraz długość całej domeny.

Sekwencja LA10SEQ002 jest podobna do sekwencji kodujących roślinne syntetazy asparaginy. Najwyższą homologię do niej wykazują AS spoza rodziny roślin motylkowatych (*Striga hermonthica*, *Helianthus annuus*, *O. sativa*, *A. thaliana*). Osiemnaście sekwencji białkowych pochodzących z roślin motylkowatych znajduje się na dalszych miejscach listy homologów. Dla większości z nich brak danych o ekspresji w symbiotycznych brodawkach. Dedukowana sekwencja białkowa markera zawiera fragment domeny syntetazy asparaginy (Rys. 13).

Sekwencja LA10SEQ003 o długości 407 nt zawiera fragment otwartej ramki odczytu kodujący 41 końcowych aminokwasów białka urykazy. Również wyniki przeszukiwań baz białkowych pokazują, że sklonowany fragment cDNA reprezentuje urykazę / nodulinę 35 z łubinu wąskolistnego (Rys. 13).

Do otrzymania cDNA syntetazy glutaminy wykorzystano pierwotnie znany fragment sekwencji cDNA GS z łubinu wąskolistnego (nr identyfikacyjny X15578). Jednak specyficzny wobec niej starter LA003 znanej okazał się nieskuteczny przy amplifikacji. Użyto zatem drugiego startera, Lang_GS_Forward_1_, o zdegenerowanej sekwencji, zaprojektowanego na podstawie sekwencji GS z różnych roślin motylkowatych. Uzyskany w ten sposób produkt LA10SEQ004 ma długość 726 pz. Zakodowany jest w nim fragment sekwencji białka o długości 153 aa, stanowiący część domeny katalitycznej syntetazy glutaminy (Rys. 13). Sekwencja LA10SEQ004 wykazuje bardzo wysokie podobieństwo do syntetaz glutaminy z szeregu różnych roślin.

Marker LA10SEQ020 ma długość 355 nt i zawiera sekwencję kodującą 52 końcowe aminokwasy białka enolazy. Wskazuje na to wysokie podobieństwo do różnorodnych enolaz roślinnych, w tym białka z pokrewnego gatunku *L. luteus* oraz zidentyfikowanie fragmentu funkcjonalnej domeny enolazy podczas przeszukania bazy CDD (Rys. 13).

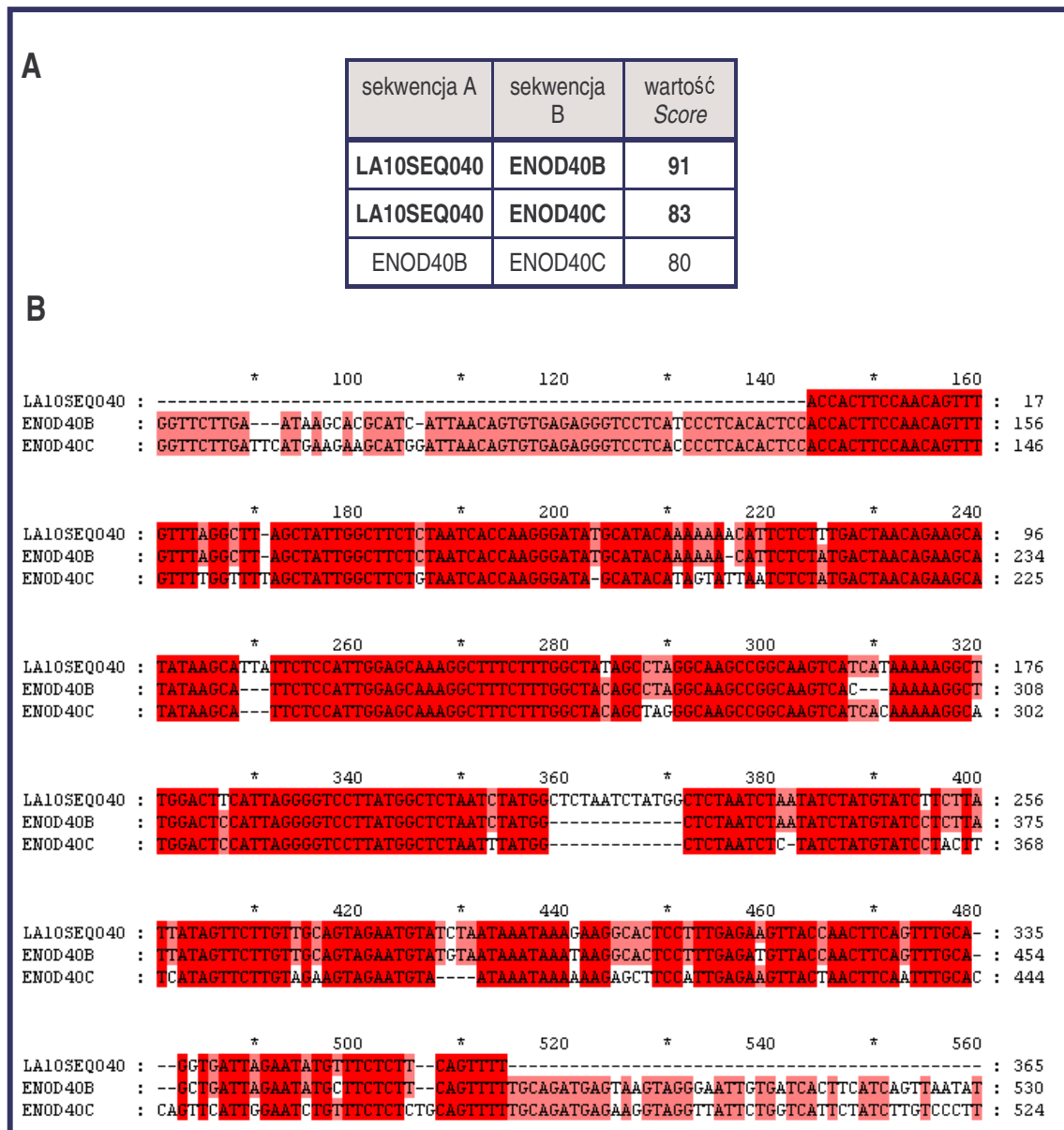
Fragment cDNA oznaczony jako LA10SEQ021 wykazuje znaczące podobieństwo do karboksylaz fosfoenolopirogronianu, przede wszystkim z roślin motylkowatych. Zakodowany w nim fragment białka o długości 191 aa odpowiada C-końcowemu fragmentowi funkcjonalnej domeny PEPC (Rys. 13).

Sekwencja LA210SEQ022 koduje fragment syntazy sacharozy (54 aminokwasy z końca C białka). Wykazuje on prawie idealną zgodność z C-końcowymi odcinkami białek SUCS z wielu różnych roślin.

D.2.2.2. Markery procesu brodawkowania

Amplifikowano również fragmenty cDNA trzech z sześciu genów nodulinowych: ENOD40 (LA10SEQ040), noduliny 45 (LA10SEQ041) i noduliny 26 (LA10SEQ042). Marker LA10SEQ040 wykazuje największe podobieństwo do cDNA dwóch genów z *L. luteus* - ENOD40B i ENOD40C (Rys. 14). Gen ENOD40B ulega indukcji na wczesnym etapie rozwoju symbiotycznych brodawek łubinowych i – inaczej niż ENOD40C, wykazujący mniejsze podobieństwo do markera z łubinu wąskolistnego - nie jest wyrażany w organach niesymbiotycznych [Podkowiński i wsp., w przygotowaniu]. Sekwencja LA10SEQ041 o długości 437 nt wykazuje idealną zgodność z 3'-końcowym fragmentem cDNA noduliny-45 z łubinu wąskolistnego (numer identyfikacyjny Z12625) i zawiera odcinek kodujący ostatnie 55 aminokwasów tego białka. Z kolei marker LA10SEQ042 wykazuje podobieństwo do białek z rodziny akwaporyn, a największe – do brodawkowo-specyficznej noduliny-26. Zakodowany w sekwencji markera fragment polipeptydowy o długości 112 aminokwasów wykazuje zgodność z domenami nadrodziny MIP (ang. *major intrinsic protein*, Rys. 13), tworzącymi kanały błonowe dla jonów i drobnych cząsteczek. Sekwencja LA10SEQ042 nakłada się na sekwencję EST-u LA02EST050, również adnotowanego jako nodulina-26.

W przypadku pozostałych genów (ENOD5, ENOD7 i ENOD12) żaden z zaprojektowanych starterów nie pozwolił na wybiórczą amplifikację żądanych fragmentów cDNA.



Rysunek 14. Porównanie sekwencji nukleotydowej LA10SEQ040 z cDNA ENOD40B i ENOD40C z tubinu żółtego. A. Wartości Score dla poszczególnych par sekwencji, wg programu ClustalW. B. Zestawienie sekwencji.

D.2.2.3. Markery szlaku transdukcji sygnału inicjowanego przez czynnik Nod

W ramach klonowania cDNA genów zaangażowanych we wczesne etapy sygnalizacji pomiędzy rośliną, a jej mikrosymbiontem, amplifikowano fragment cDNA genu *SYMRK* (LA10SEQ091). Jak wykazało porównanie z homologami *SYMRK* z innych roślin, uzyskano fragment cDNA zawierający prawie całą ORF; 857- aminokwasowy fragment białka obejmuje domenę kinazową oraz fragment domeny LRR. Podjęto także próbę otrzymania fragmentu sekwencji kodującej lektynę o właściwościach apyrazy,

zgodnie z ówczesnym stanem wiedzy, sugerującym, że białko to może być receptorem czynnika Nod (por. punkt A.1.4). Nie udało się jednak uzyskać odpowiedniego produktu amplifikacji. Po pojawieniu się pierwszych doniesień o receptorach *NFR1* i *NFR5* przystąpiono do klonowania fragmentów cDNA tych genów. Ostatecznie udało się amplifikować 923 nt sekwencji kodującej *NFR5* (marker LA10SEQ090), zawierającej duży fragment domeny kinazowej. (Dokładną charakterystykę sekwencji receptorów przedstawiono w punktach D.5.4 i D.5.5).

Dla *NFR1* nie uzyskano produktów RT PCR na matrycy RNA z korzeni łubinu wąskolistnego. Stosując startery F1NFR1 i R1NFR1 namnożono fragmenty cDNA z pokrewnych gatunków – *L. luteus* i *L. mutabilis* (nie przedstawiono wyników), ale wysokie podobieństwo uzyskanych sekwencji zarówno do *NFR1 / Sym10* jak i ich bardziej odległych homologów z *M. truncatula* (*Lyk3*, *Lyk4*, *Lyk1*, *Lyk6*) nie pozwoliło jednoznacznie stwierdzić, czy sklonowane fragmenty rzeczywiście reprezentują żądany gen. Zarzucono zatem dalsze próby amplifikacji fragmentu *NFR1*.

D.2.2.4. Pozostałe markery

Z powodzeniem amplifikowano geny związane z sygnalizacją hormonalną i reakcjami obronnymi rośliny. Sekwencja LA10SEQ080 wykazuje podobieństwo do rodziny genów AUX / IAA, których transkrypcja indukowana jest hormonem auksyną. W sekwencji aminokwasowej zakodowanej w sekwencji markera LA10SEQ080 znaleziono fragment domeny charakterystycznej dla białek z tej rodziny (Rys. 13). Marker LA10SEQ081 wykazuje homologię z roślinnymi syntazami chalkonowymi (EC 2.3.1.74, Rys. 13) – kluczowymi enzymami szlaku biosyntezy fenylopropanoidów. Sekwencja LA10SEQ082 zawiera fragment domeny peroksydazy (Rys. 13) i wykazuje podobieństwo do roślinnych alfa-dioksygenaz, katalizujących utlenianie kwasów tłuszczowych.

Uzyskano również fragment cDNA aktywny (LA10SEQ064) – genu powszechnie stosowanego jako marker o konstytutywnej ekspresji. Analiza otwartych ramek odczytu oraz analizy porównawcze pokazują, że sklonowany odcinek koduje 166 aminokwasów z końca C białka (Rys. 13), za którym następuje region 3' UTR.

D.3. Analiza częstości występowania sekwencji EST w bibliotekach LA01 i LA02

Dysponując dwiema kolekcjami sekwencji EST z łubinu zbadano ich unikalność w obrębie każdej z bibliotek oraz pomiędzy nimi. Używając programu BlastN przeszukano bazę dbEST po kolei każdą sekwencją z bibliotek LA01 i LA02, bez użycia filtrów maskujących, ograniczając wyszukiwanie hasłem „LA01* OR LA02*”. Następnie grupowano wszystkie sekwencje o znaczącym podobieństwie ($E < 10^{-5}$) i analizowano ich złożenie używając programu CAP. W ten sposób otrzymano sześć zestawów (kontigów) sekwencji, które nakładają się na siebie (Rys. 15 - 20). Wysoki stopień identyczności sekwencji w obrębie kontigów wskazuje, że mogą one reprezentować transkrypty tego samego genu.

Analiza częstości występowania sekwencji EST pokazała, że wszystkie klony w obrębie biblioteki LA01 są unikalne. W bibliotece LA02, otrzymanej przez selekcję klonów na podstawie wcześniejszych analiz ekspresji, znaleziono szereg powtarzających się klonów. Na kontig 3 składają się trzy krótkie sekwencje, nie mające homologów w bazach danych (LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043, Rys. 17). W kontigu 4 znalazły się dwie sekwencje adnotowane jako proteazy serynowe (LA02EST006 i LA02EST055, Rys. 18). Zestaw 5 grupuje trzy sekwencje adnotowane jako leghemoglobiny: LA02EST009, LA02EST051 i LA02EST054 (Rys. 19). Sekwencja LA02EST048, również wykazująca podobieństwo do leghemoglobin, nie została włączona przez program CAP do tego kontigu. Jak wskazują wyniki adnotacji funkcjonalnej, EST LA02EST048 jest najbardziej podobny do leghemoglobiny typu II z łubinu żółtego, podczas gdy każda z sekwencji tworzących kontig 5 wykazuje największe podobieństwo do łubinowej leghemoglobiny typu I. Zatem – zgodnie z przewidywaniami programu – LA02EST048 reprezentuje inny gen. Pozostałe trzy kontigi (1, 2 i 6), zawierające po 2 lub 3 sekwencje, adnotowane są jako małe jądrowe RNA. Zawierają sekwencje zarówno z biblioteki LA01 jak i LA02 (Rys. 15, 16, 20).

LA02EST002+	AGATCAAGTGTAGTATCTGTTCTTATCAGTTTAATATCTGATATGTGGGTCATTGGCCCA
LA01EST064+	TTTAATATCTGATATGTGGGTCATTGGCCCA
consensus	AGATCAAGTGTAGTATCTGTTCTTATCAGTTTAATATCTGATATGTGGGTCATTGGCCCA
LA02EST002+	CACGATATTAAATTACTTTTTTAAAGGGGAGAAG-CCA-TCACAGTAGCTTGCTACTGGG
LA01EST064+	CATGATATTAAATTACTTTTTTAAAGGGGA-AGGCCACT-ACAGTAGCTTGCTATTGGG
LA02EST013+	GCTTGCTATTGGG
consensus	CACGATATTAAATTACTTTTTTAAAGGGGAGAAGGCCACTCACAGTAGCTTGCTATTGGG
LA02EST002+	C-TTCTCGTGTGTCGCCTAA-GCGTTGCACTTAGCTTTGGCCTGGCACGCCCTCTGAAA
LA01EST064+	CCTT-TCACGTGTCGC-TCATGCGTTGCACTAAGCATGGGCTTGGCACGCCCTCTCAA
LA02EST013+	C-TTCTCATGTGTCGCCTAA-GTGTGCACTAAGCTTGGCCTGGCACACCCT---AAA
consensus	C-TTCTCATGTGTCGCCTAA-GCGTTGCACTTAAGCTTGGCCTGGCACGCCCTCTCAA

Rysunek 15. Kontig 1 – złożenie sekwencji LA02EST002 – LA02EST013 – LA01EST064.

LA02EST052+	CAGTTCTAATATCTGATATGTGGGTCAATGGCTNCACGATATTAATTACTTTTTGAAAG
consensus	CAGTTCTAATATCTGATATGTGGGTCAATGGCTNCACGATATTAATTACTTTTTGAAAG
LA02EST052+	GGGTGAGTCCACCACAGTAGCTGGCTATTGGCCTCTCACGTCTCGCTCAAGCGTTGCAC
LA01EST066+	GGTCTCT-ATGTCTCGC-CAAGCGTTGCAC
consensus	GGGTGAGTCCACCACAGTAGCTGGCTATTGGCCTCTCACGTCTCGCTCAAGCGTTGCAC
LA02EST052+	TAAAGCTTGGGCCGGGCACACCCT--C---CAAAA
LA01EST066+	TATAGCTTGGGCTTGGCGCACCCCTAACTATCAAAAAAATAAAA
consensus	TAAAGCTTGGGCCGGGCACACCCTAACTATCAAAAAAATAAAA

Rysunek 16. Kontig 2 – złożenie sekwencji LA02EST052 – LA02EST066.

LA02EST004+	TACTTGGTGGGATGCTTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAGTTCAATAGGAATAGGTTGTT
LA02EST005+	TACTTGGTGGGATGCTTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAGTTCA-TAGGAATAGGTTGTT
LA02EST043+	GGTGGGATGCTTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAGTTCAATAGGAATAGGTTGTT
consensus	TACTTGGTGGGATGCTTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAGTTCAATAGGAATAGGTTGTT
LA02EST004+	TCTTCCTAACTATAGA-CTTAGGAACATGTAACCTCTTCTTCTTCAATATATTGGGGTGT
LA02EST005+	TCTTCCTAACTATAGATCTTAGGAACATGTAACCTCTTCTTCTTCAATATATTGGGGTGT
LA02EST043+	TCTTCCTAACTATAGA-TTAGGAACATGTAACCTCTTCTTCTTCAATATATTGGGGTGT
consensus	TCTTCCTAACTATAGA-CTTAGGAACATGTAACCTCTTCTTCTTCAATATATTGGGGTGT
LA02EST004+	TCCACCCAGCTTTAAAA
LA02EST005+	TCCACCCAGCTTTAAAA
LA02EST043+	TCCACCCAGCTTTAAAA
consensus	TCCACCCAGCTTTAAAA

Rysunek 17. Kontig 3 – złożenie sekwencji LA02EST004 – LA02EST005 – LA02EST043.

LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TAGGTGGTGCAGCTATGATTATCATCAACGACGAAATCAATGGCTTCAGTCTCGAAGCTG
consensus		TAGGTGGTGCAGCTATGATTATCATCAACGACGAAATCAATGGCTTCAGTCTCGAAGCTG
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	ATGCACATGTTCTACCTGCAACTCATGTAAGCTATGCTGCTGGACTGAAGATTAAGGCTT
consensus		ATGCACATGTTCTACCTGCAACTCATGTAAGCTATGCTGCTGGACTGAAGATTAAGGCTT
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	ATATAAECTCCACTGCAACACCTACAGCGACCATTTTATTTAAGGGAACGATTCTCGGAA
consensus		ATATAAECTCCACTGCAACACCTACAGCGACCATTTTATTTAAGGGAACGATTCTCGGAA
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	ACTCTCTATCTCCTGCTGTTGCATCTTCTC- TT-CAAGAGGTCCAAACTTGGCAAGTCC
LA02EST055+		ATTNCA---- GTCCAAACTTGGCAAGTCC
consensus		ACTCTCTATCTCCTGCTGTTGCATCTTCTCATTNCAAGAGGTCCAAACTTGGCAAGTCC
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TGGCATCTTGAAACCAGATATCATAGGGCCAGGTGCGGGCATCCTAGCTGCTTACCATT
LA02EST055+		TGGCATCTTGAAACCAGATATC NTAGGGCCAGGTGCGGGCATCCTAGCTGCTTACCANT
consensus		TGGCATCTTGAAACCAGATATCATAGGGCCAGGTGCGGGCATCCTAGCTGCTTACCATT
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CGCAATCGATAACAGCAGCAAT-TC AAAGTCCA ATTCAACATTATGTCTGGGACATCAA
LA02EST055+		CGCAATCGATAACAGCAGCAATCT CAAAGTCCA ANN TC AAACATTATGTCTGGGACATCAA
consensus		CGCAATCGATAACAGCAGCAATCTCAAAGTCCAATTCAACATTATGTCTGGGACATCAA
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TGTCATGCCCTCATCTTAGTGGCATTGCTGCTTTGCTCAAAAGCTCGCATCCTGAATGGT
LA02EST055+		TGTCATGCCCTCATCTTAGTGGCATTGCTGCTTTGCTCAAAAGCTTCATCCTGAATGGT
consensus		TGTCATGCCCTCATCTTAGTGGCATTGCTGCTTTGCTCAAAAGCTCGCATCCTGAATGGT
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CTCCAGCTGCGATAAAATCTGCCATAATGACTTCTGCAGACCTACTACACGTAGGACTTG
LA02EST055+		CTCCAGCTGCGATAAAATCTGCCATAATGACTTCTGCAGACCTACTACACGTAGGACTTG
consensus		CTCCAGCTGCGATAAAATCTGCCATAATGACTTCTGCAGACCTACTACACGTAGGACTTG
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	AACCTATTGTCGATGAAACACTCAAGCCTGCAGATATCTTTGCGACAGGTTCTGGTCATG
LA02EST055+		AACCTATTGTCGATGAAACACTCAAGCCTGCAGATATCTTTGCGACAGGTTCTGGTCATG
consensus		AACCTATTGTCGATGAAACACTCAAGCCTGCAGATATCTTTGCGACAGGTTCTGGTCATG
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TGAATCCATCAAGAGCAAATGACCCTGGATTAGTTTATGATATCCAACCTGATGATTATA
LA02EST055+		TGAATCCATCAAGAGCAAATGACCCTGGATTAGTTTATGATATCCAACCTGATGATTATA
consensus		TGAATCCATCAAGAGCAAATGACCCTGGATTAGTTTATGATATCCAACCTGATGATTATA
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TACCCTATCTGTGTGGTTTGGGCTACAGCAATAATGAAATTGGGATCATTACACAGAGAA
LA02EST055+		TACCCTATCTGTGTGGTTTGGGCTACAGCAATAATGAAATTGGGATCATTACACAGAGAA
consensus		TACCCTATCTGTGTGGTTTGGGCTACAGCAATAATGAAATTGGGATCATTACACAGAGAA
LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	AAATCAATTGTGCC-CAGTGTCAAACATTCCCGAAGGAGATCTCA-TTATCCTTCATTT-
LA02EST055+		AAATCAATTGCGCCACAGTGTCAAACATTCCCGAATGAGATCTCAATTATCCTTCATTTT
consensus		AAATCAATTGCGCCACAGTGTCAAACATTCCCGAAGGAGATCTCAATTATCCTTCATTTT

Rysunek 18. Kontig 4 – złożenie sekwencji LA02EST006 – LA02EST055.

LA02EST006+	. : . : . : . : . : . : . : . :	CAGTTGTGCTTGGTCCCTCACAGACATTCCA-GAACCGTGACAA-TGTC-G-G
LA02EST055+	. : . : . : . : . : . : . : . :	CAGTTGTGCTTGGTCCCTCACAGACATTACAAGAACCGTGACAAATGTCTGTGAGGCCT
consensus		CAGTTGTGCTTGGTCCCTCACAGACATTACAAGAACCGTGACAAATGTCTGTGAGGCCT
LA02EST055+	. : . : . : . : . : . : . : . :	ATTCATCCTATGCTGTCATTGTTACAGAACCAGAAGGGGTGAAGTGAAGGTCCATCCAA
consensus		ATTCATCCTATGCTGTCATTGTTACAGAACCAGAAGGGGTGAAGTGAAGGTCCATCCAA
LA02EST055+	. : . : . : . : . : . : . : . :	TGAACTTCTTTTTTCAGAAGTGAACCGGAAAGCGCATATTCAGTGACTTCACCGTATCGGG
consensus		TGAACTTCTTTTTTCAGAAGTGAACCGGAAAGCGCATATTCAGTGACTTCACCGTATCGGG
LA02EST055+	. : . : . : . : . : . : . : . :	TTAGGTATAGGACAGGGGAATATATTCAGGGTCTAGATGGGTCTCTGATGAACACTCTG
consensus		TTAGGTATAGGACAGGGGAATATATTCAGGGTCTAGATGGGTCTCTGATGAACACTCTG
LA02EST055+	. : . : . : . : . : . : . : . :	TAGGAGCCAATCTCTGTATATTTGAATAC
consensus		TAGGAGCCAATCTCTGTATATTTGAATAC

Rysunek 18. Kontig 4 cd.

LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	AAGGAATATGGCTATTTTAACTGATGTGCAAGTGGCTTGGTGAAGAGTTCATTTGAAGA
consensus		AAGGAATATGGCTATTTTAACTGATGTGCAAGTGGCTTGGTGAAGAGTTCATTTGAAGA
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	ATTTAACGCAAATATTCCTAAACACACCCATCGTTTCTCACCTTGGTACTAGAGATTGC
consensus		ATTTAACGCAAATATTCCTAAACACACCCATCGTTTCTCACCTTGGTACTAGAGATTGC
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	ACCAACAGCAAAGGATTTGTTCTCATTGTTGAAGGGCACTAATGAAGTACCACAGAATAA
consensus		ACCAACAGCAAAGGATTTGTTCTCATTGTTGAAGGGCACTAATGAAGTACCACAGAATAA
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	TCCTGATCTCCAGGCTCATGCTGGAAAGGTTTTTAAGTTGACTTACGAAGCAGCAATTCA
consensus		TCCTGATCTCCAGGCTCATGCTGGAAAGGTTTTTAAGTTGACTTACGAAGCAGCAATTCA
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	ACTTCAAGTGAATGGAGCAGTGGCGACAGATGCCACGTTGAAAAATTTGGGCTCTGTACA
consensus		ACTTCAAGTGAATGGAGCAGTGGCGACAGATGCCACGTTGAAAAATTTGGGCTCTGTACA
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	TGTCTCAAAGGAGTCATTGATGCCACTTTCCGGTGGTGAAGGAAGCAATTCTGAAAAC
consensus		TGTCTCAAAGGAGTCATTGATGCCACTTTCCGGTGGTGAAGGAAGCAATTCTGAAAAC
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . :	AATAAAGGAAGTAGTGGGAGACAAATGGAGCGAGGAAGTGAACAATGCTGGACTATAGC
consensus		AATAAAGGAAGTAGTGGGAGACAAATGGAGCGAGGAAGTGAACAATGCTGGACTATAGC

Rysunek 19. Kontig 5 – złożenie sekwencji LA02EST009 – LA02EST051 – LA02EST054.

LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CTATGACGAATTGGCAATTATAATTAAGAAGGAGATGAAGGATGCTGCTTAATTTCAAAC
consensus		CTATGACGAATTGGCAATTATAATTAAGAAGGAGATGAAGGATGCTGCTTAATTTCAAAC
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	TCATCACCTATTGCAATAAATAATGAATTTTATTTTCAGTAATACTTGTGAATA-AGTT
LA02EST054+		CAGTT
consensus		TCATCACCTATTGCAATAAATAATGAATTTTATTTTCAGTAATACTTGTGAATACAGTT
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CTTGTTATAAATGTTGTTTAAAATGTAAATGGGTTGGTTCAC TTGATCGACCTTCCCTTA
LA02EST054+		CTTGTT-TAA-TGTTGTTTAAAATGTAAATGGGTTGGTTCAC TTGATCGACCTTCCCTTA
consensus		CTTGTTATAAATGTTGTTTAAAATGTAAATGGGTTGGTTCAC TTGATCGACCTTCCCTTA
LA02EST051+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	ATGACAACATATTTTAGTTTCGAATCTAA--A-A
LA02EST054+		ATGACAACATATTTTAGTTTCGAATTTAAGGATATCTTAATATTATATGTACTTCCACTTC
consensus		ATGACAACATATTTTAGTTTCGAATCTAAGGATATCTTAATATTATATGTACTTCCACTTC
LA02EST054+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CACTTCCACTACAAATCCTTGCTGAGGTTGGTGGCTTGTGTTAGACCTTAAATTGGGAGA
LA02EST009+		ACTAATCCTTGCTGAGGTTGGTGGCTTGTGTTAGACCTTAAATTGGGAGA
consensus		CACTTCCACTACAAATCCTTGCTGAGGTTGGTGGCTTGTGTTAGACCTTAAATTGGGAGA
LA02EST054+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	GTCTCCCTTACGTTAAACTTTTCTTATCATAAATAAATATTATTTAAA-TAAAA
LA02EST009+		GTCTCCCTTACGTTAAACTTTTCTTATCATAAATAAATATTATTTAAA
consensus		GTCTCCCTTACGTTAAACTTTTCTTATCATAAATAAATATTATTTAAAATAAAA

Rysunek 19. Kontig 5 cd.

LA01EST061+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CTCGTTCTATAGGCTCGTAC--CTTGTGTCCTGAGTTCTAAGGAGACAAGAACCTAAGC
LA02EST033+		TCTATAGGCTCGTACTACTGGTGTCCCTGAGTTCTAAGGAGACCNGAACATAAGT
consensus		CTCGTTCTATAGGCTCGTACTACTGGTGTCCCTGAGTTCTAAGGAGACAAGAACATAAGC
LA01EST061+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	CTGGTGGATGAACCATGACCAAAA
LA02EST033+		CTGGTGGATGAACCATGACC----GTGTGATCAGAGCGTGATTAACGGCTCAGATGATCT
consensus		CTGGTGGATGAACCATGACC----GTGTGATCAGAGCGTGATTAACGGCTCAGATGATCT
LA02EST033+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	GCATGTTGTGGTCATCATCCAAGCTGTAGATGATCGTTCTTAGTTGGTGCCTACCAACTG
consensus		GCATGTTGTGGTCATCATCCAAGCTGTAGATGATCGTTCTTAGTTGGTGCCTACCAACTG
LA02EST033+	. : . : . : . : . : . : . : . : . :	GGGTGGTCACACGGTGTCTGACAGACAAAA
consensus		GGGTGGTCACACGGTGTCTGACAGACAAAA

Rysunek 20. Kontig 6 – złożenie sekwencji LA01EST061 – LA02EST033.

D.4. Ekspresja genów w trakcie rozwoju brodawki

Opisane działania doprowadziły do uzyskania trzech zestawów cDNA: i) kolekcji LA01 utworzonej przez losowy wybór klonów ze znormalizowanej biblioteki cDNA, ii) kolekcji LA02 składającej się z klonów wyselekcjonowanych w serii analiz różnicowych oraz iii) kolekcji LA10 reprezentującej geny – markery różnych procesów metabolicznych w roślinie. Kolejnym zadaniem było przeanalizowanie czasowych profili ekspresji kodujących je genów w trakcie symbiozy. Zbadano zatem i porównano ekspresję tych genów w korzeniach łubinu i w brodawkach symbiotycznych stosując technikę hybrydyzacji do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości. Następnie – w celu weryfikacji wyników – przeprowadzono hybrydyzację typu northern dla kilku wybranych sond.

D.4.1. Analiza ekspresji przy pomocy makromacierzy cDNA

Przygotowano zestaw makromacierzy, zawierających jako sondy inserty cDNA klonów z bibliotek LA01, LA02 i LA10, amplifikowane metodą PCR. No ich namnożenia użyto uniwersalnych starterów: pary LaVecF i LaVecR dla klonów z bibliotek LA01 i LA02 oraz pary JP203 i JP204 dla klonów z biblioteki LA10. Dodatkowo przygotowano zbiór jedenastu kontroli negatywnych z zestawu kontrolnego AFGC Microarray Control Set. Na zestaw składają się fragmenty cDNA genów, które nie występują naturalnie w roślinach (por. punkt C.1.1.4). Kontrole negatywne namnożono przy użyciu starterów univM13F i univM13R. Wszystkie sondy nanoszono w trzech powtórzeniach na nylonowe membrany, zachowując ich identyczny układ na każdym filtrze. Następnie poszczególne filtry hybrydyzowano z próbkami ss cDNA znakowanymi [³³P]. Preparaty cDNA pochodziły z infekowanych korzeni, zebranych na różnych etapach rozwoju brodawek symbiotycznych. Dla wszystkich analizowanych stadiów przeprowadzono także eksperymenty referencyjne (zwane dalej kontrolnymi). Polegały on na tym, że filtry hybrydyzowano z próbkami ss cDNA przygotowanymi z hodowanych równolegle korzeni w podobnym wieku, ale nieinfekowanych bradyrizobiami. Zbadano w ten sposób cztery punkty czasowe rozwoju brodawek, używając do przygotowania znakowanych prób ss cDNA następujący materiał biologiczny:

- 4 dpi
 - filtr badany (B) - fragmenty korzeni z zawiązkami brodawek, niewidocznymi jeszcze na powierzchni korzeni,
 - filtr kontrolny (A) - nieinfekowane korzenie, zebrane w tym samym czasie;
- 8 dpi
 - filtr badany (B) - fragmenty korzeni z widocznymi na powierzchni młodymi białymi brodawkami,
 - filtr kontrolny (A) - nieinfekowane korzenie, zebrane w tym samym czasie;
- 15 dpi
 - filtr badany (B) - dojrzałe, różowe brodawki i małe fragmenty korzeni,
 - wspólny filtr kontrolny (A) dla stadiów 15 dpi i 34 dpi - nieinfekowane korzenie, zebrane w stadium odpowiadającym 18 dpi;
- 34 dpi
 - filtr badany (B) - dojrzałe, różowe brodawki i małe fragmenty korzeni,
 - wspólny filtr kontrolny dla stadiów 15 dpi i 34 dpi - nieinfekowane korzenie, zebrane w stadium odpowiadającym 18 dpi

Dla każdego badanego stadium przeprowadzono dwa powtórzenia biologiczne – do każdego z nich próby ss cDNA przygotowywano z materiału uzyskanego z niezależnej hodowli roślin. Stworzono ten sposób dwie serie profili ekspresji. W obrębie danej serii zestawy filtrów użyte dla wszystkich badanych punktów czasowych były przygotowane w identyczny sposób, co umożliwiało ich późniejsze porównanie. Drobne różnice techniczne między seriami dotyczyły sposobu amplifikacji sond, ich stężenia i metody denaturacji filtrów (por. punkt C.2.16).

Po hybrydyzacji i zebraniu obrazów fluorescencji przystąpiono do pomiaru ilościowego sygnałów uzyskanych na pojedynczych filtrach. Następnie porównano wyniki uzyskane dla filtra badanego i filtra kontrolnego, określając w ten sposób względną różnicę w ekspresji każdego genu na danym etapie rozwoju brodawek korzeniowych. Na podstawie wszystkich wyników uzyskanych dla czterech punktów czasowych w danym powtórzeniu tworzono profile ekspresji poszczególnych genów. Zestawienie wszystkich analiz dla poszczególnych genów i serii zawarto w arkuszach „Analiza makromacierzy

– seria 1.xls” oraz „Analiza makromacierzy - seria 2.xls”, na dołączonym do pracy dysku CD.

D.4.1.1. Analiza pojedynczych filtrów

Na każdym filtrze obliczano intensywność sygnałów hybrydyzacji pochodzących od indywidualnych elementów makromacierzy (miejsc naniesienia pojedynczych „kropek” cDNA), skorygowaną względem średniej lokalnej intensywności tła. Pomiar ilościowy prowadzono przy pomocy oprogramowania Image Quant. Jako miarę intensywności sygnału przyjęto wartość *Sum Above Background*. Następnie obliczano średnią wartość intensywności sygnału dla trzech naniesionych obok siebie powtórzeń tej samej sondy, pod warunkiem, że rozbieżność między nimi nie była wyższa niż 30%. Wartość odbiegającą od dwóch pozostałych o więcej niż 30 % odrzucano. Uzyskany wynik obrazował poziom ekspresji genu reprezentowanego przez daną sondę. Jeśli rozrzut między wszystkimi powtórzeniami dla danej sondy był większy niż 30 % – gen wykluczano z analizy.

Niezależnie od analizy ilościowej przeprowadzono także analizę jakościową uzyskanych wyników. Wówczas skupiano się wyłącznie na detekcji poszczególnych sygnałów, a nie na ich poziomach ilościowych. Jako próg detekcji przyjęto wartość wynoszącą co najmniej 1,1 lokalnej intensywności tła otaczającego dany element makromacierzy [Györgyey i wsp. 2000]. Produkt ekspresji genu uznawano za zidentyfikowany w analizowanej próbce tylko wtedy, gdy dla co najmniej dwóch powtórzeń sondy na filtrze intensywność sygnału przekraczała wartość progową. Analiza jakościowa sond reprezentujących kontrole negatywne potwierdziła, że praktycznie we wszystkich przypadkach nie wykryto dla nich sygnału przekraczającego wartość progową, co było zgodne z oczekiwaniami (Tab. 15). Wyjątek stanowi tu kontrola Sp4 dająca pozytywny sygnał na czterech spośród 14 hybrydyzowanych filtrów.

Porównanie wyników analizy jakościowej pokazuje, że w pierwszej serii hybrydyzacji uzyskano generalnie intensywniejsze sygnały hybrydyzacji na filtrach niż w serii drugiej (Tab. 16). Odsetek sygnałów przewyższających próg detekcji na poszczególnych filtrach pierwszej serii jest bardzo wysoki - tylko dla filtrów 4 dpi-A i 4 dpi-B nie przekracza on 70 %. Tymczasem powtórzenie eksperymentu na drugiej serii

filtrów dało ogólnie słabsze rezultaty (dla etapów 4 dpi i 8 dpi mniej niż połowa sond na filtrach generowała sygnał o wartości progowej).

Klon	seria pierwsza							seria druga						
	4 dpi A (ninf)	4 dpi B (inf)	8 dpi A (ninf)	8 dpi B (inf)	18 dpi A (ninf)	15 dpi B (inf)	34 dpi B (inf)	4 dpi A (ninf)	4 dpi B (inf)	8 dpi A (ninf)	8 dpi B (inf)	18 dpi A (ninf)	15 dpi B (inf)	34 dpi B (inf)
BT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Globin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GUS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
HPH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luc	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nptII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sp4	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+

Tabela 15. Analiza jakościowa sond reprezentujących kontrole negatywne. „-” oznacza, że intensywność sygnału dla co najmniej dwóch powtórzeń sondy na filtrze była niższa niż 1,1 wartości intensywności lokalnego tła; „+” oznacza, że intensywność sygnału przewyższała progową dla co najmniej dwóch powtórzeń sondy na filtrze.

badany etap	odsetek genów o sygnale przekraczającym próg detekcji	
	seria pierwsza	seria druga
4 dpi A (ninf)	63,4 %	39,2 %
8 dpi A (ninf)	84,3 %	43,1 %
18 dpi A (ninf)	73,9 %	56,86 %
4 dpi B (inf)	68,0 %	45,7 %
8 dpi B (ninf)	83,0 %	38,6 %
15 dpi B (inf)	81,0 %	66,0 %
34 dpi B (inf)	75,8 %	76,5 %

Tabela 16. Odsetek genów o sygnale przewyższającym progową wartość detekcji na poszczególnych filtrach.

D.4.1.2. Normalizacja danych

Przed przystąpieniem do porównania danych przeprowadzono normalizację uzyskanych wartości dla par odpowiadających sobie filtrów A i B. Miała ona na celu zniwelowanie różnic pomiędzy filtrami, wynikającymi z przyczyn technicznych, a nie rzeczywistych

różnic w ekspresji. Wykorzystano w tym celu siedem sond reprezentujących geny ulegające konstytutywnej ekspresji: geny białek rybosomalnych (LA01EST006, LA01EST007, LA01EST022, LA01EST023, LA01EST032, LA02EST008) oraz gen aktyny (LA10ESQ064). Proces normalizacji zakładał, że poziom transkryptów powyższych genów w próbce badanej i kontrolnej powinien być jednakowy. Porównywano zatem względną ekspresję każdego z siedmiu genów na filtrze badanym względem filtra referencyjnego ($\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}}$) i obliczano średni współczynnik

geny o konstytutywnej ekspresji	$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 4 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 8 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 15 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 34 dpi	
	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola
LA01 EST006	1,10	1,00	1,12	1,00	1,18	1,00	0,96	1,00
LA01 EST007	1,13	1,00	0,75	1,00	1,26	1,00	1,04	1,00
LA01 EST022	0,98	1,00	1,08	1,00	1,10	1,00	0,97	1,00
LA01 EST023	1,61	1,00	1,08	1,00	1,51	1,00	1,21	1,00
LA01 EST032	0,99	1,00	1,00	1,00	1,32	1,00	1,19	1,00
LA02 EST008	0,96	1,00	0,94	1,00	1,14	1,00	0,90	1,00
LA10-64	0,92	1,00	0,89	1,00	1,59	1,00	1,41	1,00
	śr. 1,10		śr. 0,98		śr. 1,10		śr. 1,30	

Tabela 17. Normalizacja sygnału dla odpowiadających sobie par filtrów A (kontrola) i B (eksperyment) w serii 1. Dla każdej pary obliczano średni współczynnik normalizacji, względem którego korygowano wyniki ilościowego pomiaru sygnałów.

geny o konstytutywnej ekspresji	$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 4 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 8 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 15 dpi		$(\text{Int}_{\text{Bi}} / \text{Int}_{\text{Ai}})$ 34 dpi	
	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola	eksperyment	kontrola
LA01 EST006	0,62	1,00	1,17	1,00	0,97	1,00	1,13	1,00
LA01 EST007	0,28	1,00	1,00	1,00	1,07	1,00	1,12	1,00
LA01 EST022	0,87	1,00	0,93	1,00	0,79	1,00	0,84	1,00
LA01 EST023	0,82	1,00	0,89	1,00	1,03	1,00	0,97	1,00
LA01 EST032	0,57	1,00	1,16	1,00	1,43	1,00	1,30	1,00
LA02 EST008	0,61	1,00	0,96	1,00	1,23	1,00	1,07	1,00
LA10-64	0,92	1,00	0,89	1,00	1,59	1,00	1,41	1,00
	śr. 0,58		śr. 0,98		śr. 1,16		śr. 1,08	

Tabela 18. Normalizacja sygnału dla odpowiadających sobie par filtrów A (kontrola) i B (eksperyment) w serii 2. Dla każdej pary obliczano średni współczynnik normalizacji, względem którego korygowano wyniki ilościowego pomiaru sygnałów.

normalizacji, który wykorzystano do korekty wszystkich wartości na filtrze badanym (Tab. 17, 18). Różnice pomiędzy wartościami ekspresji genów konstytutywnych dla poszczególnych par były niewielkie. Co więcej, zaistniałe rozbieżności wykazywały generalnie podobną tendencję w obrębie pary porównywanych filtrów. Przykładowo, w serii pierwszej obserwowano ogólnie wyższy poziom ekspresji genów w próbie badanej 15 dpi w stosunku do kontroli (Tab. 17), odwrotnie niż na etapie 4 dpi w serii drugiej (Tab. 18). Taka zbieżność wyników potwierdza, że odzwierciedlają one przede wszystkim różnice techniczne zaistniałe podczas przygotowywania, hybrydyzacji i obróbki obu filtrów, które mogą być usunięte dzięki normalizacji.

D.4.1.3. Porównanie filtrów eksperymentalnego i kontrolnego dla danego punktu czasowego

Dysponując uśrednionymi i znormalizowanymi wartościami intensywności sygnału przystąpiono do stworzenia profili ekspresji genów w trakcie rozwoju brodawki. Względą zmianę w ekspresji genu określano mierząc stosunek wartości dla poszczególnych sond na filtrze badanym względem filtra kontrolnego, w danym stadium. Jako znaczącą uznawano co najmniej dwuipółkrotną różnicę w intensywności sygnałów: $Int_{B_i} / Int_{A_i} \geq 2,5$ oznacza indukcję ekspresji w roślinach infekowanych mikrosymbiontem; $Int_{B_i} / Int_{A_i} \leq -2,5$ oznacza obniżenie ekspresji. Jeśli sonda A_i lub B_i dla danego punktu czasowego została wykluczona na początkowych etapach analizy (por. punkt D.4.1.1), nie przeprowadzano porównania dla reprezentowanego przez nią genu. Uzyskane wyniki zestawiono, tworząc czasowe profile zmian w ekspresji genów w korzeniach w stanie symbiozy z bradyrizobiami, oddzielnie dla każdej serii.

D.4.2. Profile ekspresji genów

Poniżej przedstawiono dane uzyskane dla markerów LA10 oraz tych genów z bibliotek LA01 i LA02, dla których analiza wyników z makromacierzy wykazała znaczące zmiany w ekspresji w co najmniej jednym badanym stadium (Rys. 21 – 29). Dla każdego z genów prezentowane są wykresy obrazujące profile ekspresji uzyskane w obu seriach hybrydyzacji. Wyniki przedstawiono w skali logarytmicznej, gdzie wartość „1” reprezentuje próg indukcji, a wartość „-1” – próg supresji ekspresji genu w organach symbiotycznych w stosunku do nieinfekowanych korzeni (por. punkt D.4.1.3). Krzyżykami oznaczono te punkty wykresu, dla których dane wykluczono z analizy.

Umieszczone pod wykresami tabelki przedstawiają wyniki analizy jakościowej dla tych samych genów. Minusem oznaczono te filtry, na których sygnał pochodzący od sondy był niższy niż wartość progowa, wynosząca 1,1 intensywności lokalnego tła. Plussem oznaczono filtry, na których sondy dawały wyraźny, wyższy od zadanej wartości sygnał.

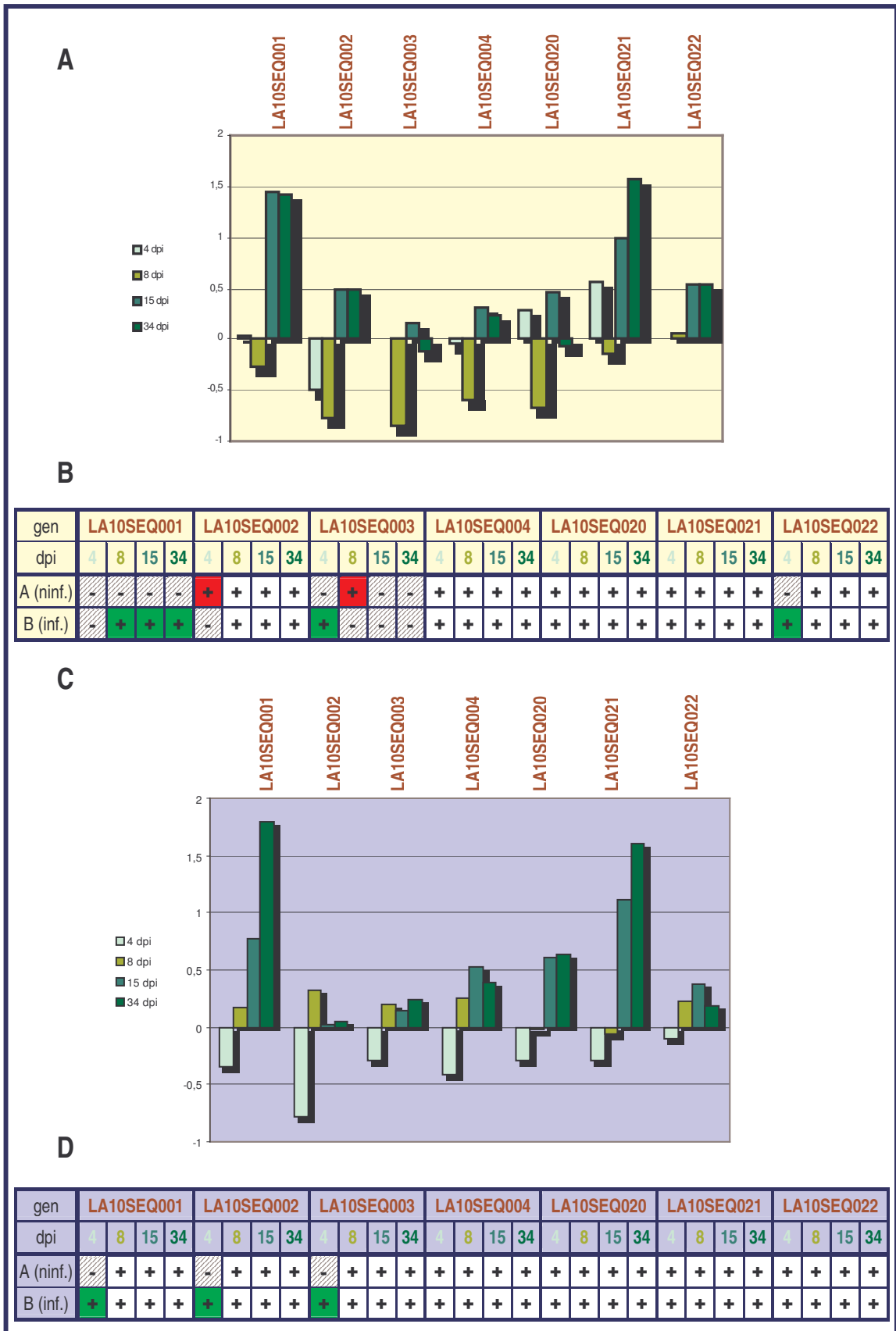
D.4.2.1. Geny markerowe (LA10)

Spośród siedmiu genów, mających służyć jako markery metabolizmu węgla i azotu w brodawkach, tylko dwa wykazują wyraźnie podwyższoną ekspresję w dojrzałych brodawkach (15 dpi i 34 dpi), w obydwu przeprowadzonych seriach hybrydyzacji (Rys. 21). Są to AAT (LA210SEQ001) i PEPC (LA10SEQ021). Wszystkie markery procesu brodawkowania wykazały, zgodnie z oczekiwaniami, wzrost ekspresji w brodawkach (Rys. 22). Indukcję ekspresji ENOD40 (LA10SEQ040) wykazano już w 8-dniowych brodawkach (seria 2). Wzrost poziomu transkryptów późnych nodulin (LA10SEQ041 i LA10SEQ042) obserwowano w stadium dojrzałych brodawek: 15 dpi i 34 dpi.

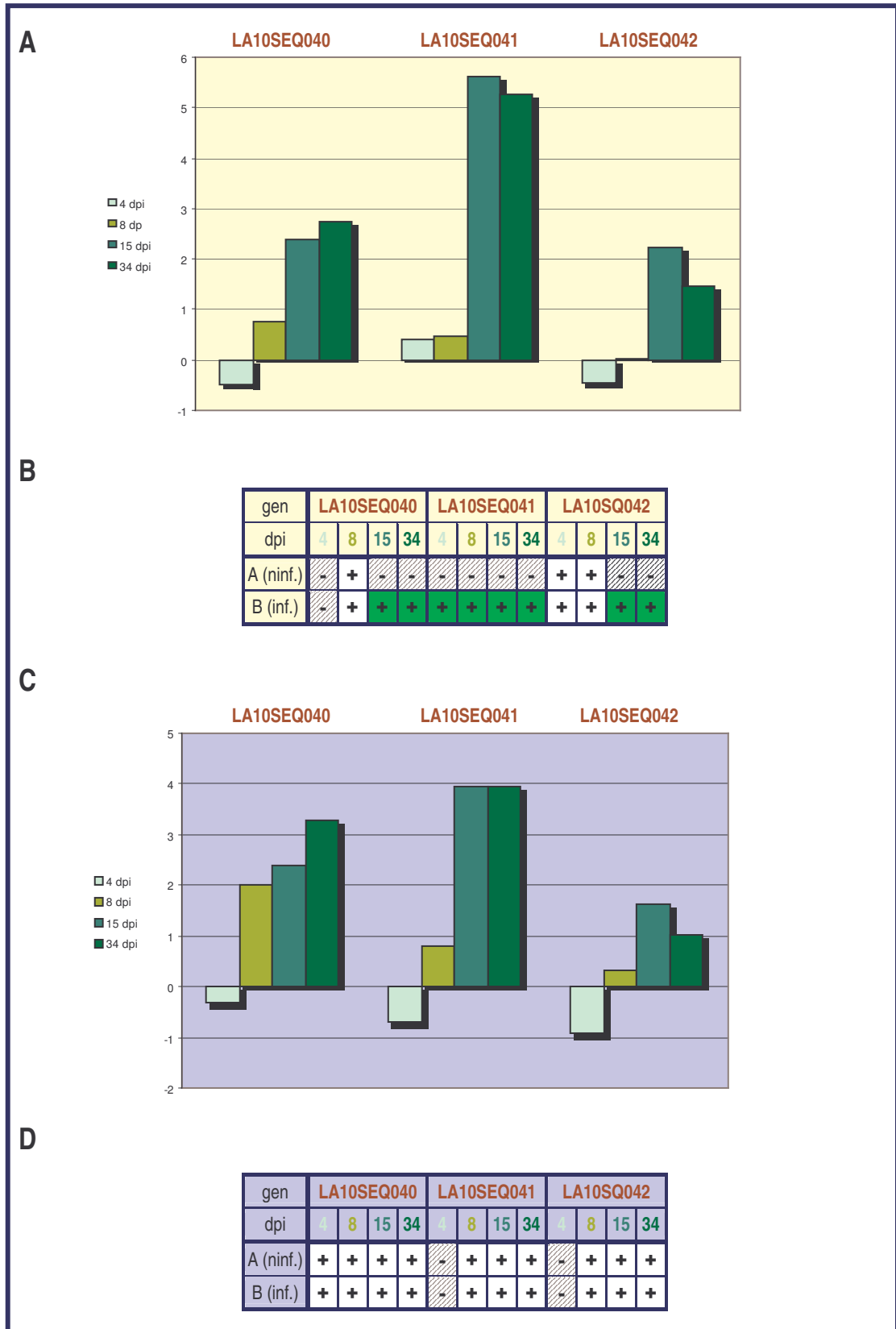
Dla żadnego z pozostałych genów markerowych nie uzyskano znaczących różnic w ekspresji pomiędzy infekowanymi i nieinfekowanymi roślinami (Rys. 23). Jedynie w przypadku markera LA10SEQ082 (alfa-dioxygenaza) analiza jakościowa przeprowadzona dla pierwszej serii wyników może sugerować drastyczne obniżenie ekspresji tego genu w organach symbiotycznych. Przy tak niskiej intensywności sygnału pochodzącego od sondy na filtrach B pomiar ilościowy mógł być poważnie zaburzony przez sygnał tła, co tłumaczyłoby brak znaczących różnic ilościowych. Jednak wyniki uzyskane dla serii drugiej nie potwierdziły jednoznacznie tych przypuszczeń.

D.4.2.2. Geny zidentyfikowane poprzez przeszukanie różnicowe (LA02)

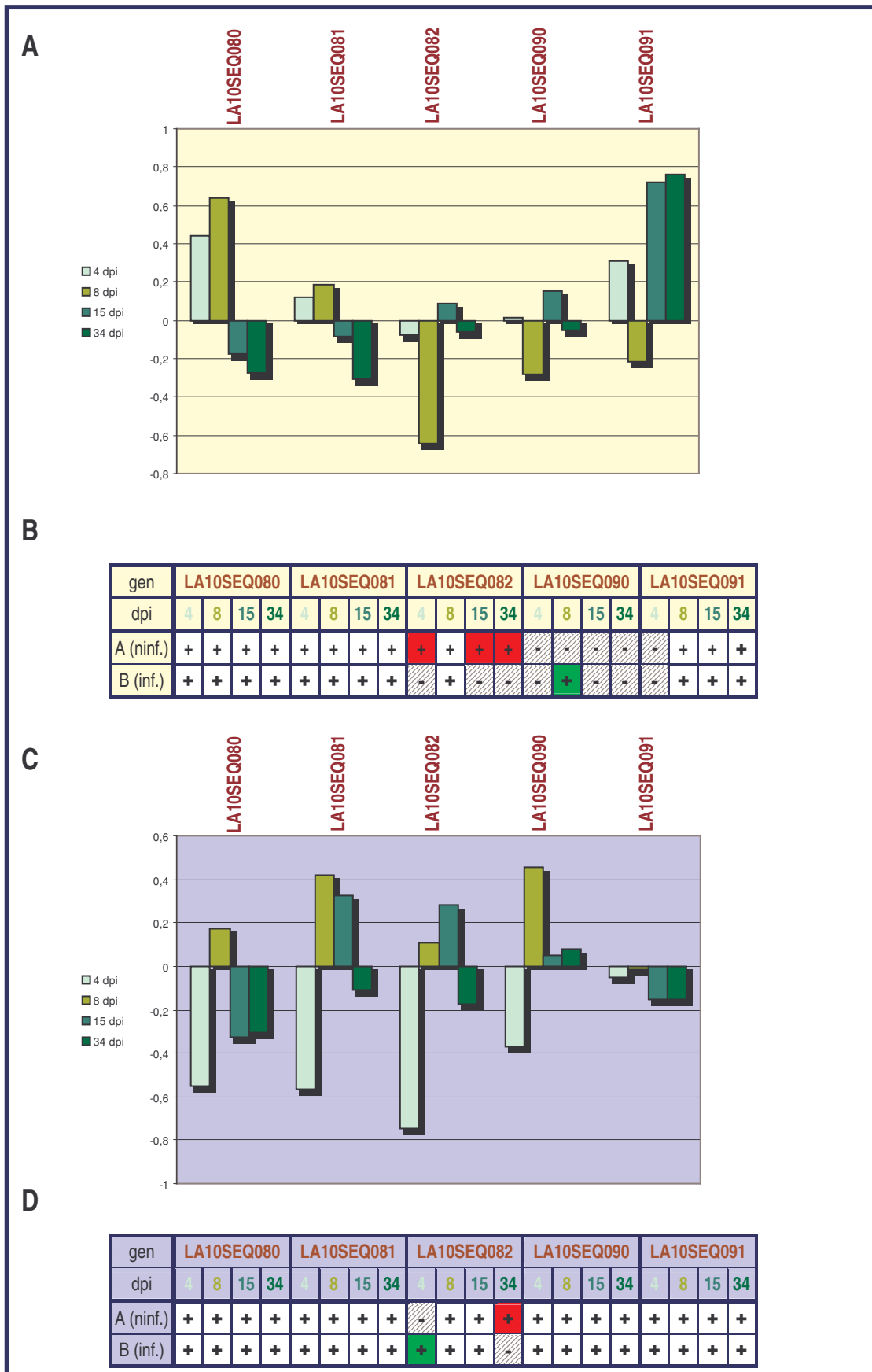
W przeprowadzonych profilowaniach ekspresji w trakcie rozwoju symbiotycznych brodawek różnicową ekspresję na co najmniej jednym badanym etapie jednej serii analiz wykazało 25 z 59 genów wybranych na podstawie wstępnych przeszukiwań różnicowych. Większość różnic dotyczy etapów reprezentujących funkcjonalne brodawki (Rys. 24 – 28).



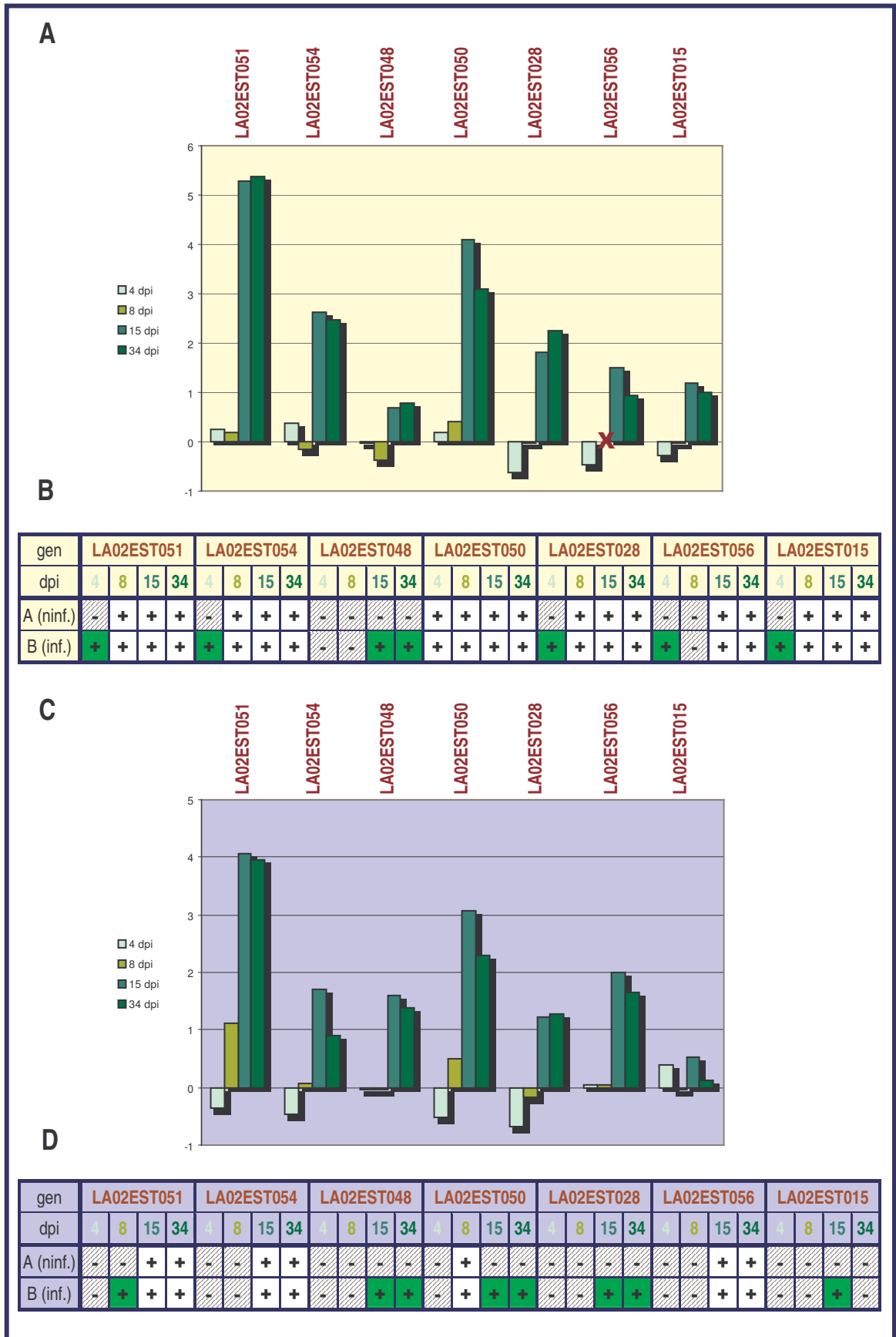
Rysunek 21. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 1. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.



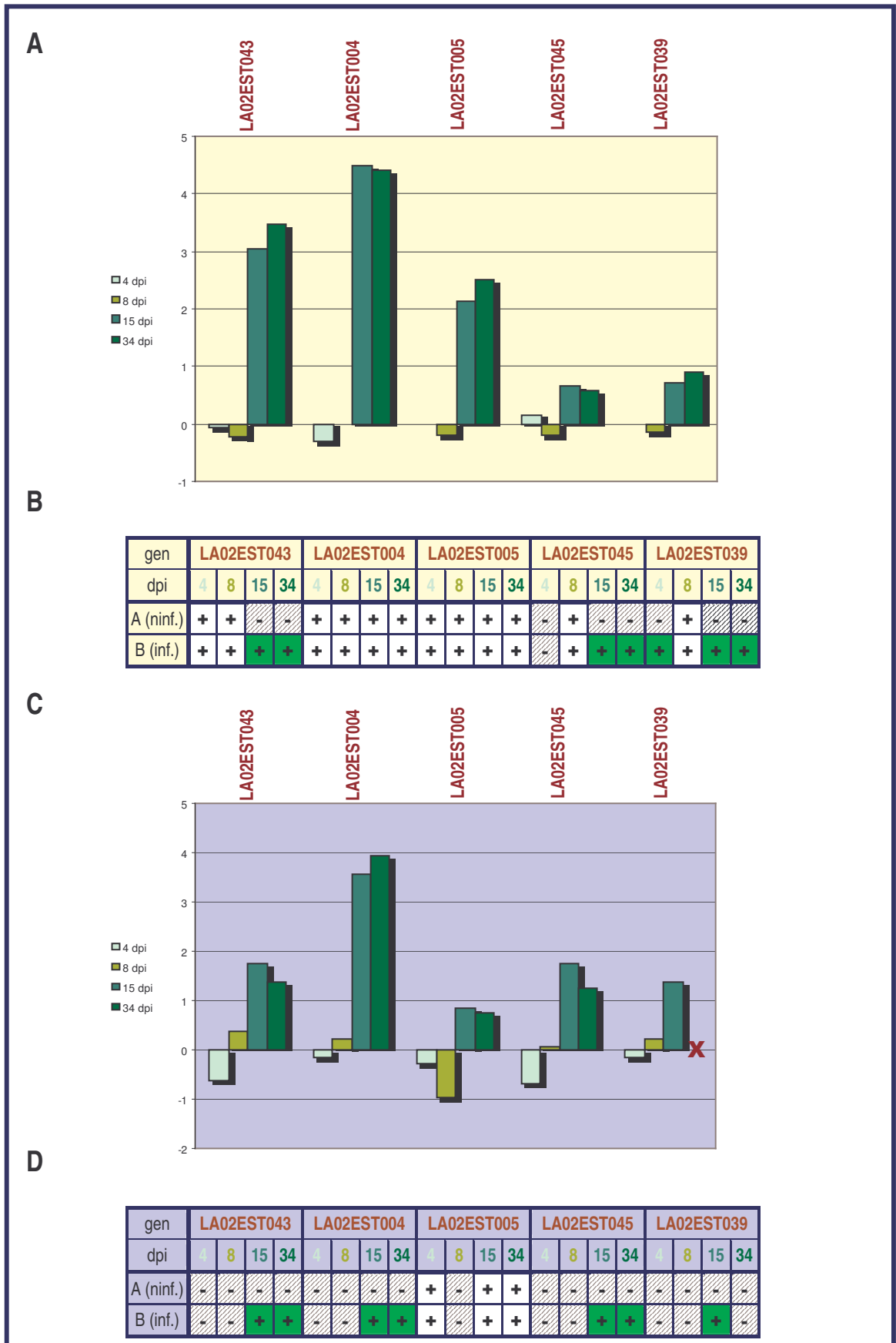
Rysunek 22. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 2. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.



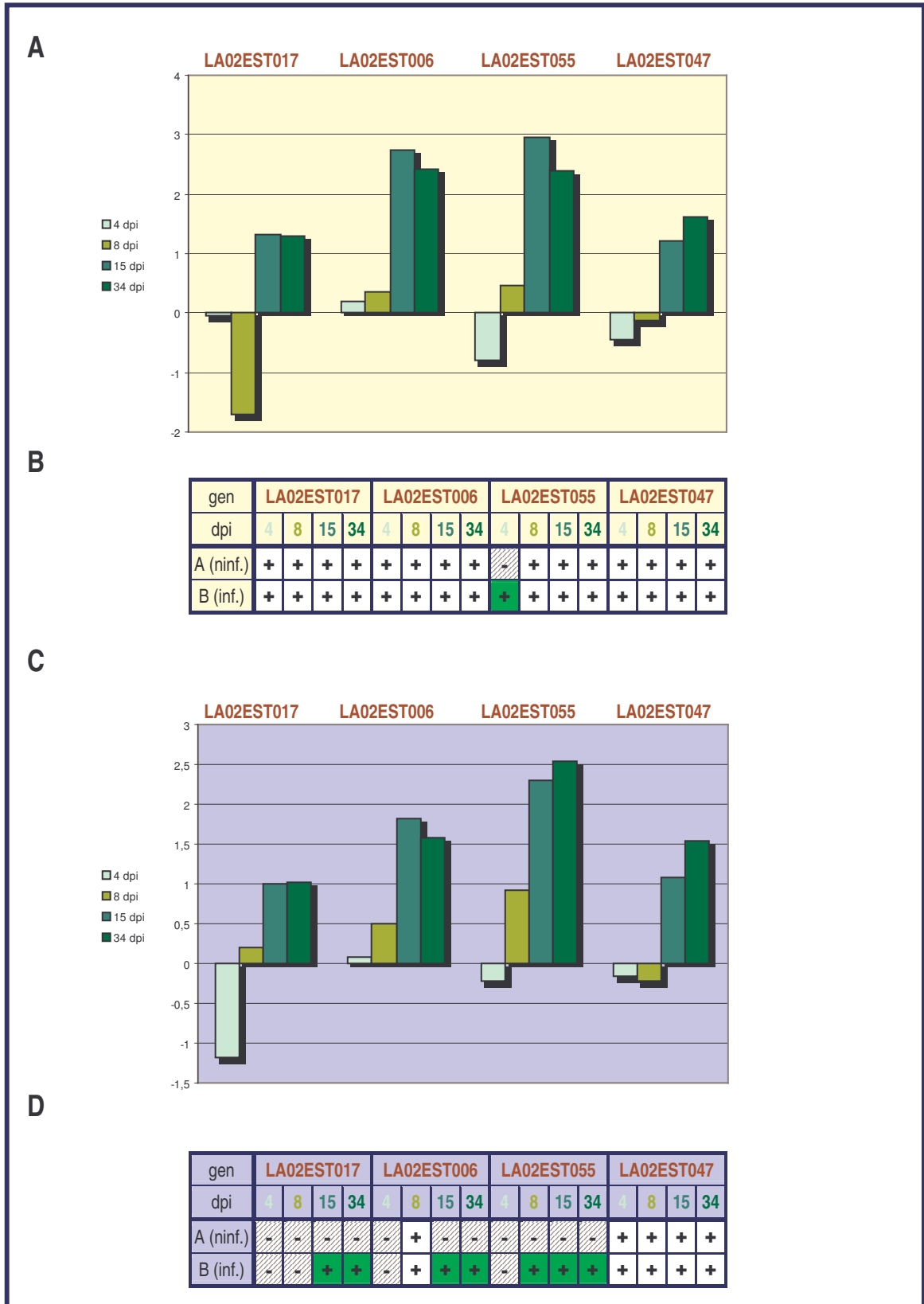
Rysunek 23. Wyniki analiz ekspresji przez hybryzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 3. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.



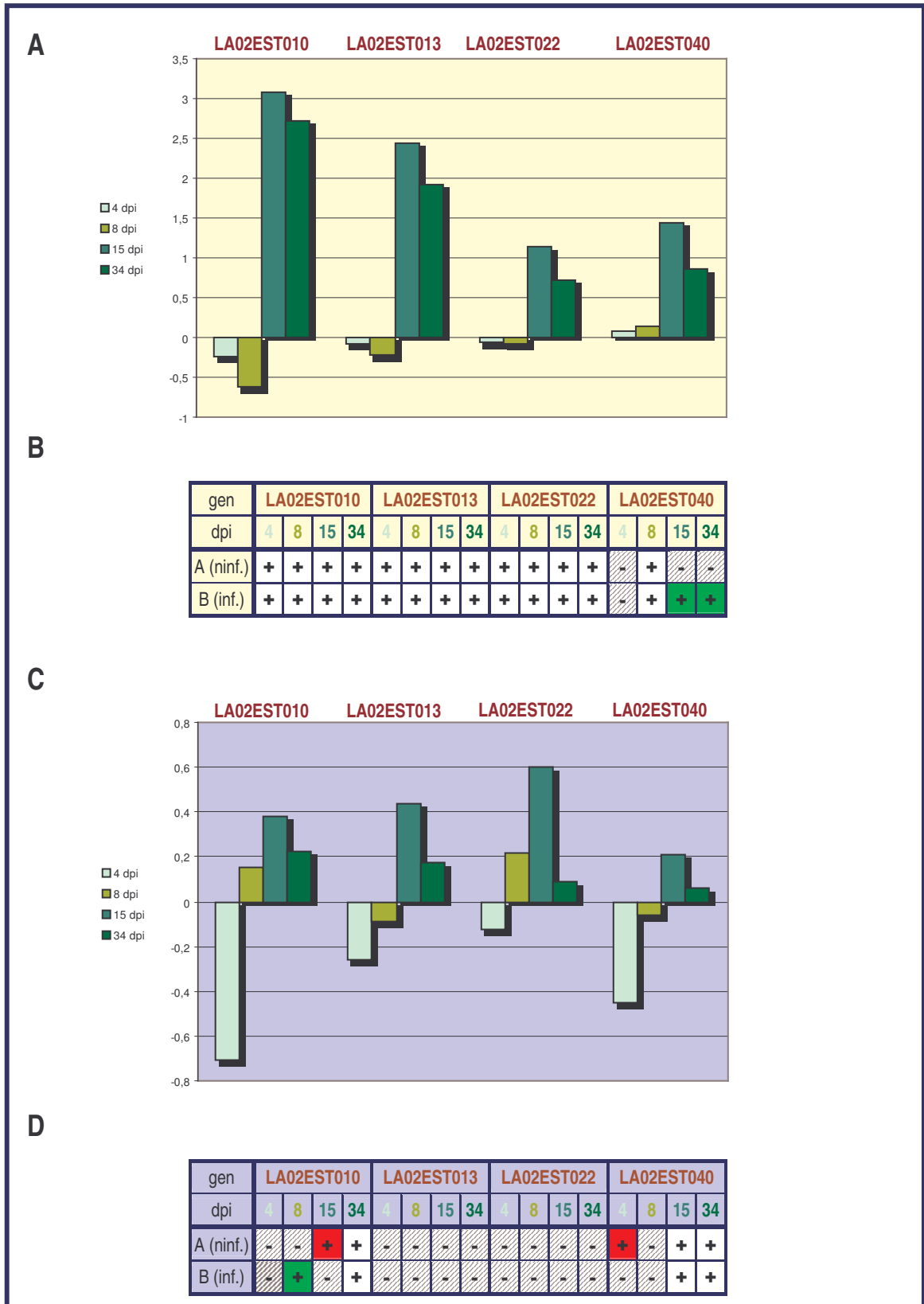
Rysunek 24. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 1. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.



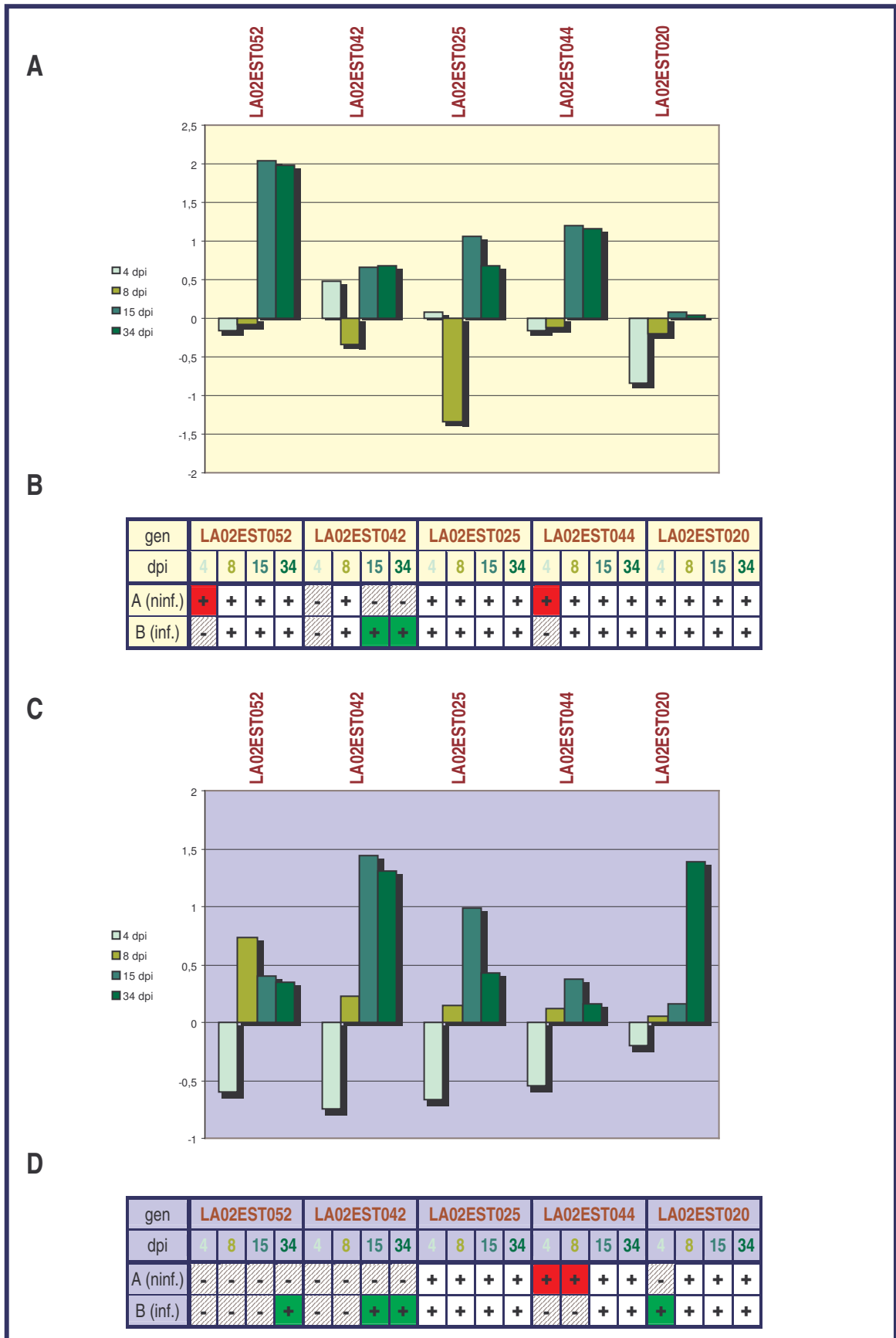
Rysunek 25. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 2. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.



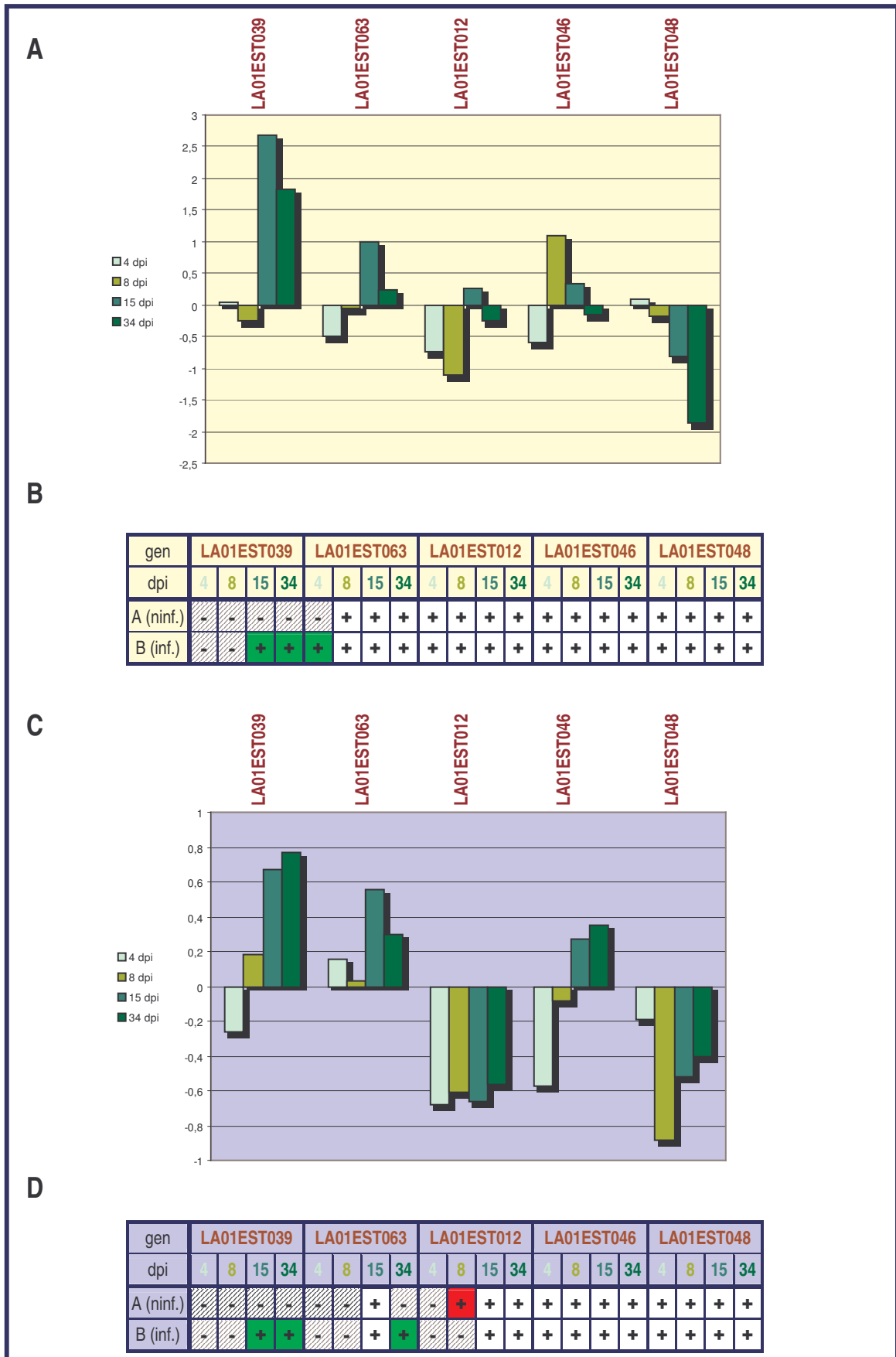
Rysunek 26. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 3. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objaśnienia w tekście.



Rysunek 27. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 4. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objaśnienia w tekście.



Rysunek 28. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 5. Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objaśnienia w tekście.



Rysunek 29. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydizację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla losowo wybranych genów (LA01). Seria pierwsza: analiza ilościowa (A) i jakościowa (B). Seria druga: analiza ilościowa (C) i jakościowa (D). Objasnienia w tekście.

Wyniki analiz genu leghemoglobiny typu II (LA02EST048) pokazują, że jest on nieaktywny w korzeniach i niedojrzałych brodawkach, i ulega specyficznej indukcji po 8 dniu od inokulacji (Rys. 24). Spośród trzech genów leghemoglobiny typu I (sekwencje tworzące kontig 5, por. podrozdział D3), dla LA02EST051 i LA02EST054 zaobserwowano różnicową ekspresję w dojrzałych brodawkach, przy czym wyniki analizy jakościowej sugerują, że pewna indukcja ekspresji tego genu może następować na wcześniejszych etapach rozwoju brodawek korzeniowych, nawet w czwartym dniu po inokulacji bakteryjnej (Rys. 24). Sygnał dla trzeciej sondy genu leghemoglobiny typu I (LA02EST009) był na zbyt niskim poziomie (poniżej progu detekcji na 13 spośród 14 filtrów – por. zestawienia analiz na dysku CD dołączonym do pracy), co tłumaczy dlaczego analiza ilościowa wyników nie wykazała dla niego różnicowej ekspresji w brodawkach.

Dla genu LA02EST050 (nodulina 26) wykazano wzrost ekspresji w dojrzałych brodawkach (Rys. 24). Jest to zgodne z danymi o ekspresji markera LA10SEQ042, reprezentującego tą samą późną nodulinę (Rys. 22). Podobny jest obraz ekspresji genu LA02EST028, o niesprecyzowanej funkcji (nieznane / ENOD18 / białko odpowiedzi na stres / białko odpowiedzi na etylen / białko z motywem palca cynkowego; Rys. 24). Jednocześnie analiza jakościowa sygnałów pochodzących od obu sond pozwala przypuszczać, że być może mamy tu do czynienia z brodawkowo-specyficzną ekspresją tych genów, choć wyniki nie wskazują na to w sposób jednoznaczny.

Kolejne geny, dla których łączne analizy wykazały znaczący wzrost bądź specyficzną indukcję ekspresji na etapie dojrzałych brodawek to:

- LA02EST056 i LA02EST015 (Rys. 24) – obie sondy reprezentują najprawdopodobniej geny mikrosymbionta;
- LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043 – wszystkie geny zawarte w kontigu 3 (por. podrozdział D3), o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej. Wykazują one zgodne profile ekspresji (Rys. 25);
- LA02EST039 i LA02EST045 – dwa geny o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej. Prawdopodobnie geny te ulegają specyficznemu włączeniu na późnych etapach rozwoju brodawek (po 8 dpi), jak sugerują wyniki analizy jakościowej (Rys. 25);

- LA02EST006 i LA02EST055 – adnotowane jako proteazy serynowe, tworzące kontig 4. Ich profile ekspresji są zgodne (Rys. 26);
- LA02EST017 – białko nieznane / białko transferu lipidów (Rys. 27);
- LA02EST047 – białko późnej embriogenezy / homolog ARG2 indukowany przez IAA (Rys. 26).

Dla czterech kolejnych genów obrazy ekspresji uzyskane w obu powtórzeniach różnią się między sobą (Rys. 27). Według wyników z pierwszej serii hybrydyzacji geny LA02EST010, LA02EST013, LA02EST022 i LA02EST040 ulegają podwyższonej ekspresji w dojrzałych brodawkach w porównaniu z nieinfekowanymi korzeniami, jednak dane ilościowe uzyskane w drugiej serii nie potwierdzają tego. W przypadku LA02EST013 (podobieństwo do sekwencji genomowej *M. truncatula*) i LA02EST022 (podobieństwo do hipotetycznego białka) sygnały pochodzące od sond były poniżej progu detekcji na każdym filtrze w drugiej serii. Zatem poprawność profili ekspresji utworzonych na podstawie pierwszej serii nie jest wykluczona, choć wymaga to weryfikacji. Z uwagi na rozbieżne wyniki otrzymane dla LA02EST010 (białko nieznane / hipotetyczne białko z motywem „RING finger”) i LA02EST040 (bez adnotacji funkcjonalnej), również stworzenie właściwych profili ekspresji dla tych genów wymaga dalszych badań.

Wszystkie dwadzieścia genów opisanych powyżej wybrano w trzeciej fazie przeszukiwań różnicowych z uwagi na ich podwyższoną ekspresję w dojrzałych brodawkach. Dane uzyskane w dwóch seriach hybrydyzacji do makromacierzy o wysokiej gęstości potwierdziły opisany wzorzec ekspresji. Jednak również dla pięciu genów, które na ostatnim etapie przeszukiwań różnicowych wykazały spadek ekspresji w brodawkach (por. punkt D.1.4), w tym doświadczeniu uzyskano odwrotne wyniki – wzrost ekspresji (Rys. 28). Są to:

- LA02EST020 – adnotowany jako dekarboksylaza UDP-glukuronianu. Obserwowany w serii drugiej wyraźny wzrost ekspresji w brodawkach 34 dpi jest całkiem różny od wyniku uzyskanego dla brodawek młodszych, ale reprezentujących podobne stadium funkcjonalne (15 dpi). Jest on również różny od wzorca ekspresji tego genu z pierwszej serii hybrydyzacji;

- LA02EST025 – podobny do białka o nieznannej funkcji. Obie serie eksperymentów pokazują wzrost ekspresji tego genu w brodawkach 15 dpi, choć w starszych brodawkach (34 dpi) nie wykrywa się już różnicowej ekspresji;
- LA02EST042 – bez homologów w bazach danych. Analizy jakościowe dla obu serii pokazują, że gen ten ulega ekspresji w brodawkach 15 dpi i 34 dpi, podczas gdy nie jest wykrywalna jego ekspresja w korzeniu;
- LA02EST044 – adnotowany jako fosfolipaza C. Dane ilościowe uzyskane w serii pierwszej pokazują różnicową ekspresję genu w dojrzałych brodawkach (15 dpi i 34 dpi). Jednak wyniki z serii drugiej nie potwierdzają tych profili;
- LA02EST052 – podobny do U2 snRNA. Wyniki serii pierwszej pokazują wzrost ekspresji tego genu w brodawkach. Sygnały uzyskane w serii drugiej są bardzo słabe (poniżej poziomu detekcji na sześciu z siedmiu filtrów), zatem rozbieżne wyniki nie wykluczają poprawności uzyskanego w pierwszej serii profilu.

D.4.2.3. Geny losowo wybrane (LA01)

Spośród 67 przeanalizowanych genów z biblioteki LA01 tylko dla pięciu wykazano znaczące zmiany ekspresji w co najmniej jednym stadium rozwoju brodawek korzeniowych (Rys. 29). Wartość progowa indukcji bądź supresji przekroczona była każdorazowo tylko w pierwszej serii analiz. Obserwowana indukcja ekspresji genu LA01EST039 o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej dotyczyła obu etapów reprezentujących dojrzałe brodawki (15 dpi i 34 dpi). W drugim powtórzeniu eksperymentu nie wykazano różnicowej ekspresji, jednak wyniki analizy jakościowej sugerują specyficzne aktywowanie ekspresji tego genu w brodawkach – w obu seriach tylko sygnały dla filtrów 15 dpi-B i 34 dpi-B były powyżej progu detekcji. Mogło to zaburzyć wyniki pomiarów ilościowych. Dla genów LA01EST063 i LA01EST046 wykazano indukcję ekspresji tylko w jednym badanym stadium – odpowiednio 15 dpi i 8 dpi. Jednak dane uzyskane w drugiej serii analiz makromacierzowych nie potwierdzają tych wyników. Dla dwóch pozostałych genów wykazano znaczący spadek ekspresji, również tylko na jednym z badanych etapów (8 dpi dla LA01EST012 i 34 dpi dla LA01EST048). Jednak mimo że w drugiej serii zaobserwowano podobne tendencje w zmianie ich ekspresji, to obserwowane różnice Int_B / Int_A są mniejsze niż dwuipółkrotne. Dla LA01EST012, adnotowanego jako białko - kanał jonowy, wytłumaczenie tych rozbieżności może stanowić analiza jakościowa dla etapu 8 dpi drugiej serii – podprogowa wartość sygnału hybrydyzacji dla stadiów 4 dpi i 8 dpi

mogła zaburzyć wyniki pomiarów. Jednocześnie analiza jakościowa potwierdza ujemną regulację ekspresji genu w młodych brodawkach (etap 8 dpi).

D.4.3. Analiza ekspresji przy pomocy hybrydyzacji northern

Aby zweryfikować poprawność wzorców ekspresji genów otrzymanych dzięki makromacierzom cDNA, przeprowadzono analizy northern dla ośmiu genów wykazujących różnicową ekspresję w brodawkach. Siedem z nich pochodziło z kolekcji LA02 (LA02EST004, LA02EST010, LA02EST028, LA02EST040, LA20EST042, LA02EST050, LA02EST051), a jeden – z kolekcji LA01 (LA01EST048). Sondy dla poszczególnych genów przygotowano amplifikując inserty odpowiednich plazmidów oraz znakując je [³²P]. Na membrany naniesiono RNA wyizolowany z brodawek korzeniowych w podobnych stadiach rozwoju, co przy analizie makromacierzowej (4 dpi, 8 dpi, 16 dpi i 34 dpi). Przeanalizowano także wpływ niedoboru przyswajalnych form azotu w podłożu na ekspresję tych genów w nieinfekowanych korzeniach (zebranych po 7 oraz 14 dniach hodowli bez dostarczania związków azotowych). Do testów kontrolnych wykorzystano hodowane równolegle i podlewane pełną pożywką nieinfekowane korzenie łubinu, zebrane w stadiach odpowiadających 0- 7- i 14 dniom od inokulacji mikrosymbiontem lub zastosowania głodu azotowego. Dodatkowo sprawdzono poziom transkrypcji badanych genów w liściach i młodych nasionach łubinu. W celu skontrolowania jakości oraz stężenia RNA użytego do hybrydyzacji zastosowano wybarwienie bromkiem etydyny (Rys. 30A).

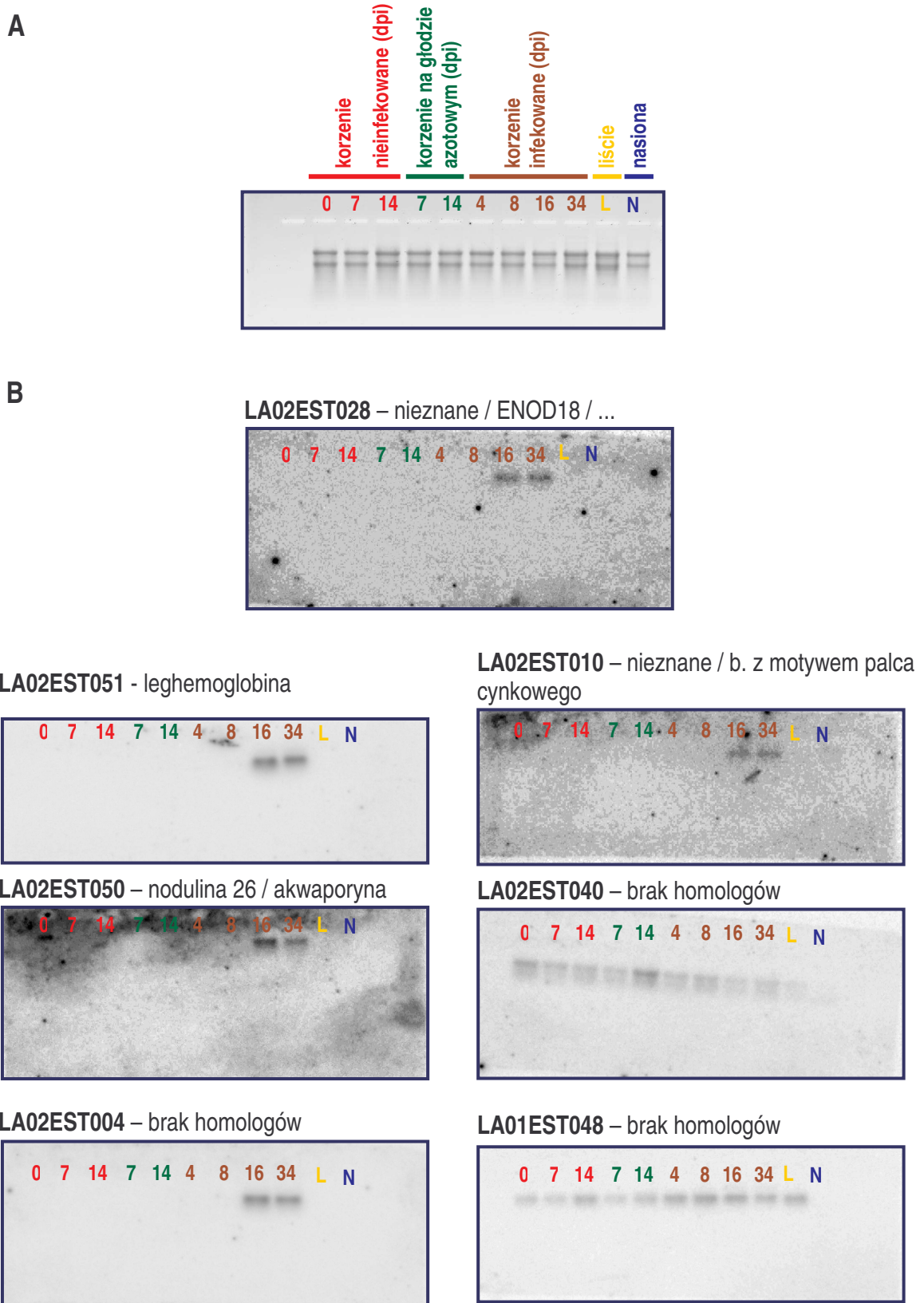
Hybrydyzacja northern pozwoliła potwierdzić różnicową ekspresję pięciu genów (Rys. 30B). Profil ekspresji genu leghemoglobiny typu I (LA02EST051 – specyficzna indukcja w brodawkach 16 i 34 dpi) stanowi jednocześnie wyznacznik fazy symbiozy, w której ma już miejsce wiązanie azotu. Analiza northern nie potwierdziła ekspresji tego genu we wcześniejszych stadiach organogenezy brodawek, co sugerowały częściowo wyniki uzyskane przy pomocy makromacierzy cDNA (por. Rys. 24). Identyczne wzorce ekspresji (zgodne również z wynikami pochodzącymi z hybrydyzacji makromacierzy) uzyskano dla noduliny 26 – LA02EST050, opisywanej w literaturze jako późna nodulina (por. Rys. 24), genu o nieznannej funkcji, reprezentowanego przez sekwencję LA02EST004 (por. Rys. 25) oraz genu o niesprecyzowanej adnotacji funkcjonalnej – LA02EST028 (por. Rys. 24). Wykazuje on

podobieństwo między innymi do genu wczesnej noduliny ENOD18, jednak zarówno wyniki analiz makromacierzowych jak i hybrydyzacji northern sugerują, że produkt ekspresji tego genu należy raczej do późnych nodulin. Piątym genem, dla którego wykazano specyficzną indukcję ekspresji w dojrzałych brodawkach, jest gen kodujący nieznane białko, być może zawierające motyw „RING finger” – LA02EST010. Na różnicową ekspresję tego genu wskazywały wcześniej wyniki tylko jednej serii analiz makromacierzowych (por. Rys. 27).

Dane o różnicowej ekspresji kolejnego analizowanego genu (LA02EST040 o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej) również pochodziły tylko z jednej serii eksperymentów makromacierzowych (por. Rys. 27). W przypadku tego genu analiza northern nie potwierdziła ich poprawności – wykazano obecność transkryptów tego genu we wszystkich analizowanych próbach. Wydaje się za to, że poziom ekspresji tego genu nieznacznie zwiększa się w warunkach głodu azotowego.

Niespecyficzną ekspresję wykazała także analiza northern genu LA01EST048 (bez homologów w bazach danych), podczas gdy dane uzyskane przy pomocy makromacierzy wskazywały na ujemną regulację jego ekspresji w dojrzałych brodawkach (por. Rys. 29).

Dla genu LA02EST042, nie mającego homologów w bazach danych, nie zaobserwowano sygnałów po hybrydyzacji z żadną z prób RNA (nie przedstawiono na rysunku). W związku z tym poprawność otrzymanego wcześniej profilu ekspresji pozostaje nierozstrzygnięta.



Rysunek 30. Analiza ekspresji typu northern grupy genów wybranej na podstawie wyników profilowania ekspresji przy użyciu makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości. A) obraz RNA (1µg / ścieżkę) po elektroforezie i wybarwieniu bromkiem etydyny; B) obraz filtrów po hybrydyzacji ze specyficznymi sondami znakowanymi [³²P].

D.5. Indywidualna analiza sekwencji wybranych genów

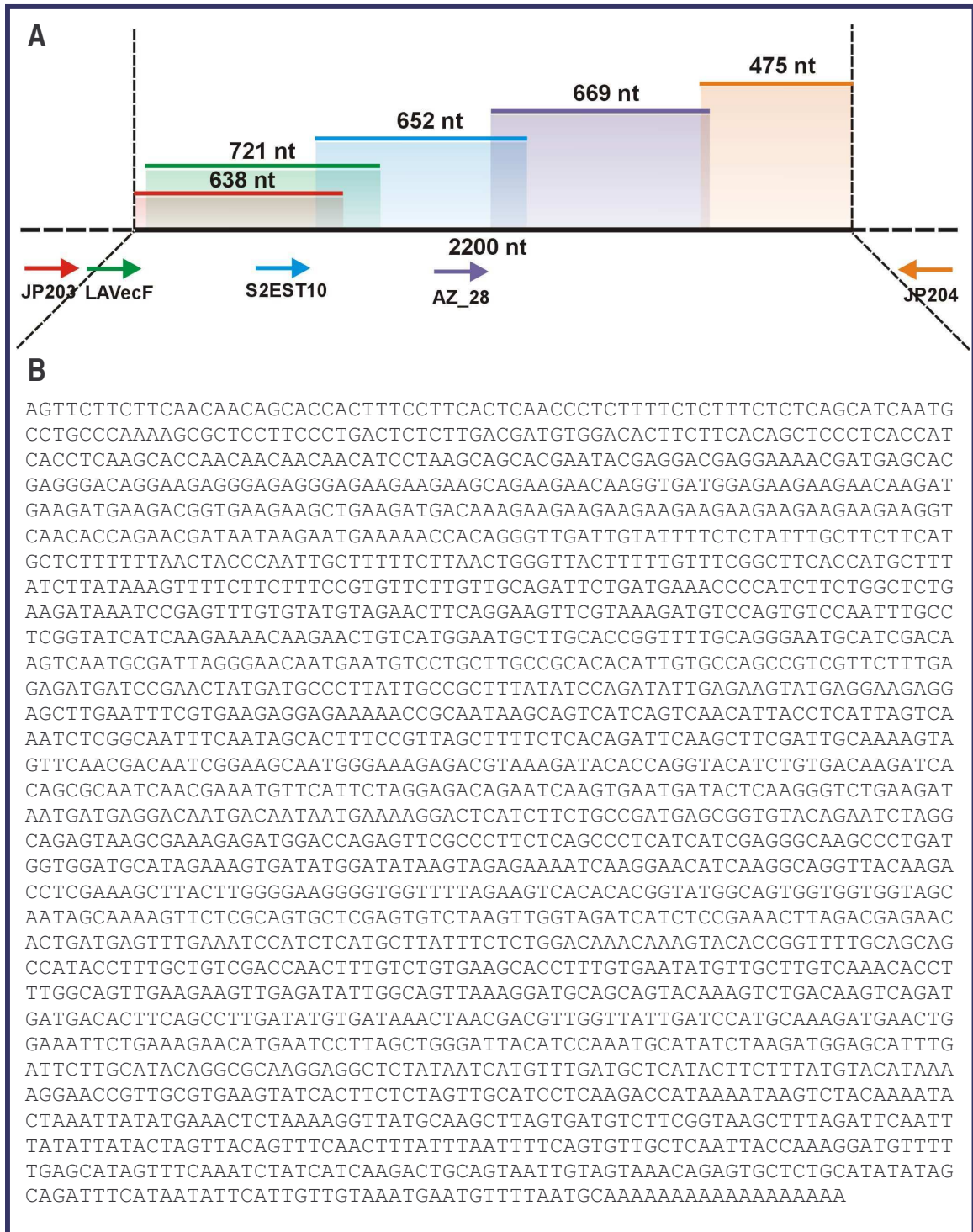
Spośród genów o ekspresji specyficznym indukowanej w brodawkach (co potwierdzono także przy pomocy analizy northern) wybrano kilka i poddano je dokładniejszej analizie bioinformatycznej. Jednocześnie podjęto próbę ustalenia pełnej sekwencji cDNA klonów LA02EST010 i klonów zgrupowanych w kontigu 3. Otrzymano i zanalizowano także pełne sekwencje cDNA łubinowych homologów receptorów *NFR5* oraz *SYMRK*.

D.5.1. LA02EST010

Jak pokazała analiza PCR z użyciem uniwersalnych starterów, insert, z którego otrzymano EST LA02EST010 ma długość ponad 2.000 pz (Rys. 10). Zsekwencjonowano zatem cały insert (Rys. 31), otrzymując ostatecznie sekwencję o długości 2200 nt, której nadano roboczą nazwę LA02-010. Sekwencję cDNA przetłumaczono następnie na sekwencję aminokwasową. W żadnej z sześciu możliwych ramek odczytu nie udało się wyodrębnić pojedynczej dominującej ORF (Rys. 32). W tej sytuacji przeszukano białkowe bazy danych sekwencją nukleotydową LA02-010, stosując algorytm blastx. Znalezione kilkadziesiąt białek o znaczącej homologii. Sekwencje pochodziły z roślin niemotylikowatych (głównie *O. sativa* i *A. thaliana*) oraz zwierząt (plik wynikowy „LA02-010 blastx.htm” zawarto na dołączonym do pracy dysku CD, w folderze „Indywidualna analiza sekwencji”). Najczęściej powtarzające się adnotacje funkcjonalne tych białek to: białko z domeną „RING finger”, czynnik transkrypcyjny, białko wiążące jony cynku / ligaza ubikwitynowa / białko wiążące proteiny oraz białko nieznane lub hipotetyczne. Wśród trafień o najwyższym podobieństwie znalazły się dwie z trzech sekwencji wykorzystanych do adnotacji funkcjonalnej sekwencji EST LA02EST010.

Podobieństwa znalezionych sekwencji do klonu LA02-010 dotyczyły trzech regionów (Rys. 33). Odpowiadają one trzem fragmentom sekwencji aminokwasowej LA02-010, utworzonym przez tłumaczenie sekwencji DNA w dwóch różnych ramach odczytu: +1 (region I i III) oraz +3 (region II) (Rys. 32). Nie można zatem wykluczyć, że podczas operacji przygotowywania znormalizowanej biblioteki cDNA lub jej dalszych analiz w

sekwencji insertu LA02-010 wystąpiła mutacja bądź mutacje, które wpłynęły na przesunięcie otwartej ramki odczytu.



Rysunek 31. Strategia sekwencjonowania insertu LA02-010. A. Częstkowe sekwencje, przedstawione jako kolorowe linie, uzyskano w wyniku reakcji zainicjowanych z udziałem starterów oznaczonych tymi samymi kolorami. Czarna linia przedstawia złożenie sekwencji insertu o dł. 2200 nt. B. Otrzymana końcowa sekwencja DNA.

```

DNA: AGTTCTTCTTCAACAACAGCACCACCTTTCTTCACTCAACCCTCTTTTCTCTTTCTCTCAGCATCAATGCCTGCCCAAAAGCGCTCCTTCCCTGACTCTCTT 102
+3:  F F F N N S T T F L H S T L F S L S L S I N A C P K A L L P * L S *
+2:  V L L Q Q Q H H F P S L N P L F S F S Q H Q C L P K S A P S L T L L
+1:  S S S S T T A P L S F T Q P S F L F L S A S M P A Q K R S F P D S L

DNA: GACGATGTGGACACTTCTTCAAGCTCCCTCACCATCACCTCAAGCACCAACAACAACAACATCCTAAGCAGCACGAATACGAGGACGAGGAAAACGATGAG 204
+3:  R C G H F F T A P S P S P Q A P T T T T S * A A R I R G R G K R * A
+2:  T M W T L L H S S L T I T S S T N N N N I L S S T N T R T R K T M S
+1:  D D V D T S S Q L P H H L K H Q Q Q Q H P K Q H E Y E D E E N D E

DNA: CACGAGGGACAGGAAGAGGGAGAGGGAGAAGAAGAAGCAGAAGAACAAGGTGATGGAGAAGAAGAACAAGATGAAGATGAAGACGGTGAAGAAGCTGAAGAT 306
+3:  R G T G R G R G R R R S R R T R * W R R R T R * R * R R * R S * R *
+2:  T R D R K R E R E K K K Q K N K V M E K K N K M K M K T V K K L K M
+1:  H E G Q E E G E G E E E A E E Q G D G E E E Q D E D E D G E E A E D

DNA: GACAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGGTCAACACCAGAACGATAATAAGAATGAAAAACCACAGGGTTGATTGTATTTTCTCTATTTGCTT 408
+3:  Q R R R R R R R R R R S T P E R * * E * K T T G L I V F S L F A S
+2:  T K K K K K K K K K V N T R T I I R M K N H R V D C I F S I C F
+1:  D K E E E E E E E E E G Q H Q N D N K N E K P Q G * L Y F L Y L L

DNA: CTTTCATGCTCTTTTTTAACTACCCAATTGCTTTTTCTTAACTGGGTTACTTTTTGTTTCGGCTTCACCATGCTTTATCTTATAAAAGTTTTCTTCTTTCCGTG 510
+3:  S C S F L T T Q L L F L N W V T F C F G F T M L Y L I K F S S F R V
+2:  F M L F F N Y P I A F S * L G Y F L F R L H H A L S Y K V F F F P C
+1:  L H A L F * L P N C F F L T G L L F V S A S P C F I L * S F L L S V

DNA: TTCTTGTTGCAGATTCTGATGAAACCCCATCTTCTGGCTCTGAAGATAAATCCGAGTTTGTGTATGTAGAACTTCAGGAAGTTCGTAAGATGTCCAGTGTG 612
+3:  L V A D S D E T P S S G S E D K S E F V Y V E L Q E V R K D V Q C P
+2:  S C C R F * * N P I F W L * R * I R V C V C R T S G S S * R C P V S
+1:  F L L Q I L M K P H L L A L K I N P S L C M * N F R K F V K M S S V

DNA: CAATTTGCCTCGGTATCATCAAGAAAACAAGAAGTGTGATGGAATGCTTGCACCGGTTTTGCAGGGAATGCATCGACAAGTCAATGCGATTAGGGAACAATG 714
+3:  I C L G I I K K T R T V M E C L H R F C R E C I D K S M R L G N N E
+2:  N L P R Y H Q E N K N C H G M L A P V L Q G M H R Q V N A I R E Q *
+1:  Q F A S V S S R K Q E L S W N A C T G F A G N A S T S Q C D * G T M

```

Rysunek 32. Tłumaczenie sekwencji cDNA LA02-010 na aminokwasową. Pogrubioną czcionką oznaczono te otwarte ramki odczytu, w których zawierają się regiony wykazujące podobieństwo do innych białek wg. programu blastx: region I (kolor niebieski), region II (kolor czerwony) i region III (kolor zielony).

```

DNA: AATGTCCTGCTTGCCGCACACATTGTGCCAGCCGTCGTTCTTTGAGAGATGATCCGAACTATGATGCCCTTATTGCCGCTTTATATCCAGATATTGAGAAAGT 816
+3:  C P A C R T H C A S R R S L R D D P N Y D A L I A A L Y P D I E K Y
+2:  M S C L P H T L C Q P S F F E R * S E L * C P Y C R F I S R Y * E V
+1:  N V L L A A H I V P A V V L * E M I R T M M P L L P L Y I Q I L R S

DNA: ATGAGGAAGAGGAGCTTGAATTTTCGTGAAGAGGAGAAAAACCGCAATAAGCAGTCATCAGTCAACATTACCTCATTAGTCAAATCTCGGCAATTTCAATAGC 918
+3:  E E E E L E F R E E E K N R N K Q S S V N I T S L V K S R Q F Q * H
+2:  * G R G A * I S * R G E K P Q * A V I S Q H Y L I S Q I S A I S I A
+1:  M R K R S L N F V K R R K T A I S S H Q S T L P H * S N L G N F N S

DNA: ACTTTCGGTTAGCTTTTCTCACAGATTCAAAGCTTCGATTGCAAAAAGTAGTTCAAACGACAATCGGAAAGCAATGGGAAAAGAGACGTAAAAGATACACCAGGTACA 1020
+3:  F P L A F L T D S S F D C K S S S T T I G S N G K E T * R Y T R Y I
+2:  L S V S F S H R F K L R L Q K * F N D N R K Q W E R D V K I H Q V H
+1:  T F R * L F S Q I Q A S I A K V V Q R Q S E A M G K R R K D T P G T

DNA: TCTGTGACAAAGATCACAGCGCAATCAACGAAATGTTTATTCTAGGAGACAGAATCAAGTGAATGATACTCAAAGGTCTGAAGATAATGATGAGGACAATGAC 1122
+3:  C D K I T A Q S T K C S F * E T E S S E * Y S R V * R * * * G Q * Q
+2:  L * Q D H S A I N E M F I L G D R I K * M I L K G L K I M M R T M T
+1:  S V T R S Q R N Q R N V H S R R Q N Q V N D T Q G S E D N D E D N D

DNA: AATAATGAAAAGGACTCATCTTCTGCCGATGAGCGGTGTACAGAATCTAGGCAGAGTAAGCGAAAAGAGATGGACCAGAGTTCCGCCCTTCTCAGCCCTCATCA 1224
+3:  * * K G L I F C R * A V Y R I * A E * A K E M D Q S S P F S A L I I
+2:  I M K R T H L L P M S G V Q N L G R V S E R D G P E F A L L S P H H
+1:  N N E K D S S S A D E R C T E S R Q S K R K R W T R V R P S Q P S S

DNA: TCGAGGGCAAGCCCTGATGGTGGATGCATAGAAAAGTGATATGGATATAAGTAGAGAAAATCAAGGAACATCAAGGCAGGTTACAAGACCTCGAAAAGCTTACT 1326
+3:  E G K P * W W M H R K * Y G Y K * R K S R N I K A G Y K T S K A Y L
+2:  R G Q A L M V D A * K V I W I * V E K I K E H Q G R L Q D L E S L L
+1:  S R A S P D G G C I E S D M D I S R E N Q G T S R Q V T R P R K L T

DNA: TGGGGAAGGGGTGGTTTTAGAAAGTCACACACGGTATGGCAGTGGTGGTGGTAGCAATAGCAAAAAGTTCTCGCAGTGCTCGAGTGTCTAAGTTGGTAGATCAT 1428
+3:  G K G W F * K S H T V W Q W W W * Q * Q K F S Q C S S V * V G R S S
+2:  G E G V V L E V T H G M A V V V V A I A K V L A V L E C L S W * I I
+1:  W G R G G F R S H T R Y G S G G G S N S K S S R S A R V S K L V D H

```

Rysunek 32. Tłumaczenie sekwencji cdNA LA02-010 cd.


```

DNA: CTCCGAAACTTAGACGAGAACAACACTGATGAGTTTGAAAATCCATCTCATGCTTATTTCTCTGGACAAAACAAAAGTACACCGGTTTTGCAGCAGCCATACCTTTGC 1530
+3: P K L R R E H * * V * N P S H A Y F S G Q T K Y T G F A A A I P L L
+2: S E T * T R T L M S L K S I S C L F L W T N K V H R F C S S H T F A
+1: L R N L D E N T D E F E I H L M L I S L D K Q S T P V L Q Q P Y L C

DNA: TGTCGACCAACTTTGTCTGTGAAGCACCTTTGTGAATATGTTGCTTGTCAAAACACCTTTGGCAGTTGAAGAAGTTGAGATATTGGCAGTTAAAGGATGCAGC 1632
+3: S T N F V C E A P L * I C C L S N T F G S * R S * D I G S * R M Q Q
+2: V D Q L C L * S T F V N M L L V K H L W Q L K K L R Y W Q L K D A A
+1: C R P T L S V K H L C E Y V A C Q T P L A V E E V E I L A V K G C S

DNA: AGTACAAAAGTCTGACAAAGTCAGATGATGACACTTCAGCCTTGATATGTGATAAACTAACGACGTTGGTTATTGATCCATGCAAAAGATGAACTGGAAAATTCTG 1734
+3: Y K V * Q V R * * H F S L D M * * T N D V G Y * S M Q R * T G N S E
+2: V Q S L T S Q M M T L Q P * Y V I N * R R W L L I H A K M N W K F *
+1: S T K S D K S D D D T S A L I C D K L T T L V I D P C K D E L E I L

DNA: AAAGAACATGAATCCTTAGCTGGGATTACATCCAAAATGCATATCTAAGATGGAGCATTGATTCTTGCATACAGGCGCAAGGAGGCTCTATAATCATGTTTG 1836
+3: R T * I L S W D Y I Q M H I * D G A F D S C I Q A Q G G S I I M F D
+2: K N M N P * L G L H P N A Y L R W S I * F L H T G A R R L Y N H V *
+1: K E H E S L A G I T S K C I S K M E H L I L A Y R R K E A L * S C L

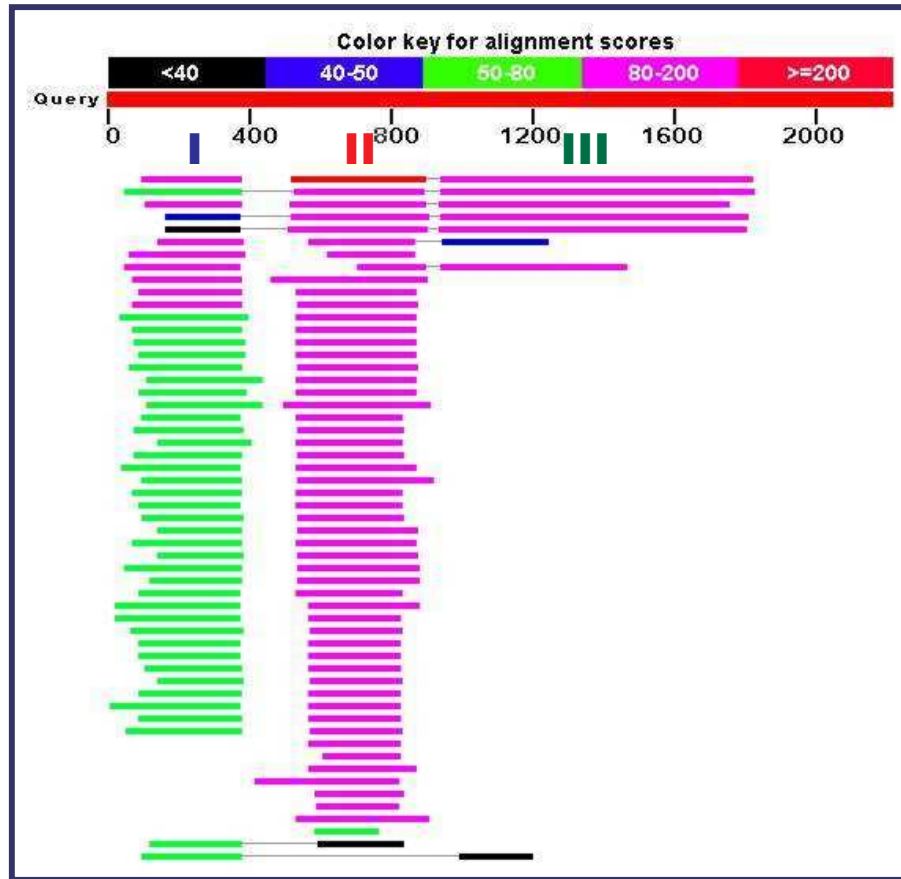
DNA: ATGCTCATACTTCTTTATGTACATAAAAAGGAACCGTTGCGTGAAGTATCACTTCTCTAGTTGCATCCTCAAGACCATAAAAATAAGTCTACAAAATACTAAAT 1938
+3: A H T S L C T * K E P L R E V S L L * L H P Q D H K I S L Q N T K L
+2: C S Y F F M Y I K G T V A * S I T S L V A S S R P * N K S T K Y * I
+1: M L I L L Y V H K R N R C V K Y H F S S C I L K T I K * V Y K I L N

DNA: TATATGAAAACCTCTAAAAGGTTATGCAAGCTTAGTGATGTCTTCGGTAAAGCTTTAGATTCAATTTATATTATACTAGTTACAGTTTCAACTTTATTTAATTTT 2040
+3: Y E T L K G Y A S L V M S S V S F R F N L Y Y T S Y S F N F I * F S
+2: I * N S K R L C K L S D V F G K L * I Q F I L Y * L Q F Q L Y L I F
+1: Y M K L * K V M Q A * * C L R * A L D S I Y I I L V T V S T L F N F

DNA: CAGTGTGCTCAATTACCAAAGGATGTTTTGAGCATAGTTTCAAATCTATCATCAAGACTGCAGTAATTGTAGTAAACAGAGTGCTCTGCATATATAGCAG 2142
+3: V L L N Y Q R M F L S I V S N L S S R L Q * L * * T E C S A Y I A D
+2: S V A Q L P K D V F E H S F K S I I K T A V I V V N R V L C I Y S R
+1: Q C C S I T K G C F * A * F Q I Y H Q D C S N C S K Q S A L H I * Q

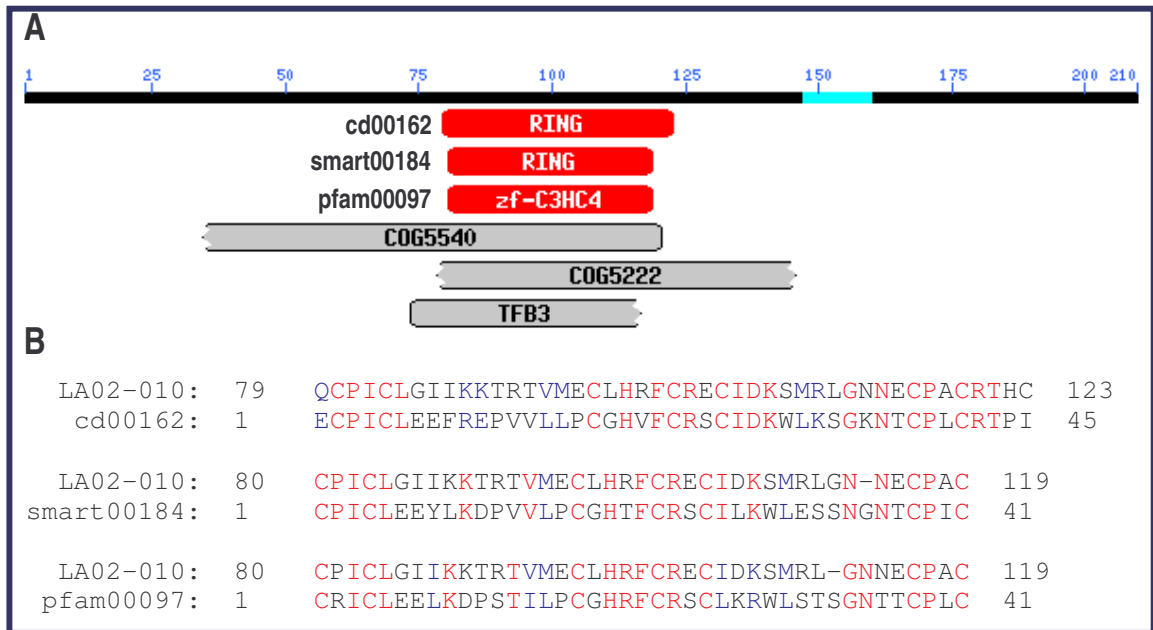
```

Rysunek 32. Tłumaczenie sekwencji cDNA LA02-010 cd.



Rysunek 33. Graficzne przedstawienie rozkładu podobieństwa klonu LA02-010 do białek znalezionych przy przeszukiwaniu baz danych, utworzone przez program Blast. Query – schematyczny rysunek sekwencji La02-010 wraz ze skalą długości. Regiony I, II i III opisano odpowiednimi kolorami, jak na Rys. 32. Pod nimi znajdują się linie obrazujące te fragmenty białek homologicznych, które wykazują do nich znaczące podobieństwo. Numery identyfikacyjne białek znajdują się w pliku wynikowym przeszukania na dysku CD.

Przy pomocy fragmentów sekwencji aminokwasowych zawierających regiony I – III przeszukano bazę konserwatywnych domen białkowych CDD (NCBI). W obrębie ORF zawierającej region II znaleziono sekwencję dokładnie odpowiadającą domenie typu „RING finger”: (podobieństwo do znalezionych w bazie domen o numerach identyfikacyjnych cd00162, smart00184, i pfam00097, Rys. 34). Trzy pozostałe trafienia dotyczą słabiej scharakteryzowanych domen, przy czym dwie z nich to także domeny typu „RING finger”. Z kolei w sekwencji regionu I, a zatem w N-końcowej części przypuszczalnego produktu białkowego znajduje się fragment bogaty w kwas glutaminowy (Rys. 32).



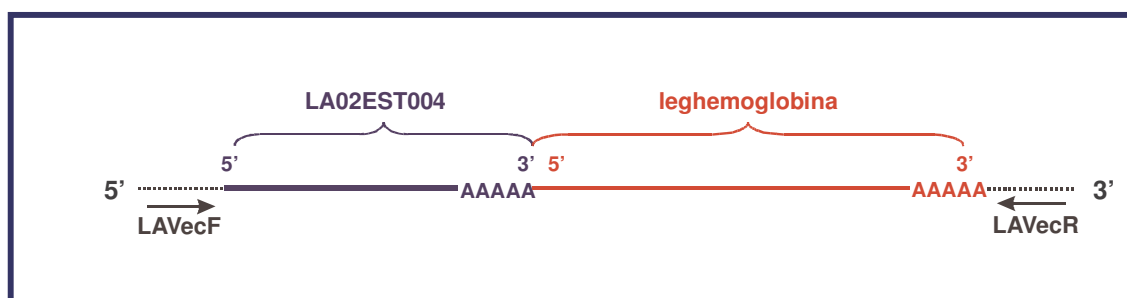
Rysunek 34. Wynik przeszukania bazy CDD fragmentem sekwencji LA02-010 zawierającej region II. A Graficzne przedstawienie wyników z orientacyjnym położeniem znalezionych domen. B Porównanie sekwencji domen „RING finger” z sekwencją LA02-010.

Przeszukanie bazy EST wyłącznie roślinnego pochodzenia przy pomocy sekwencji LA02-010 zaowocowało znalezieniem podobnych cDNA z innych roślin motylkowatych, głównie *G. max* oraz *M. truncatula*. Znalezione sekwencje EST pochodziły z bibliotek cDNA reprezentujących zarówno symbiotyczne jak i niesymbiotyczne organy i tkanki (por. plik wynikowy „LA02-010 blastn EST.htm”, umieszczony na dołączonym do pracy dysku CD, w folderze „Indywidualna analiza sekwencji”).

D.5.2. LA02EST004 / LA02EST005/ LA02EST043

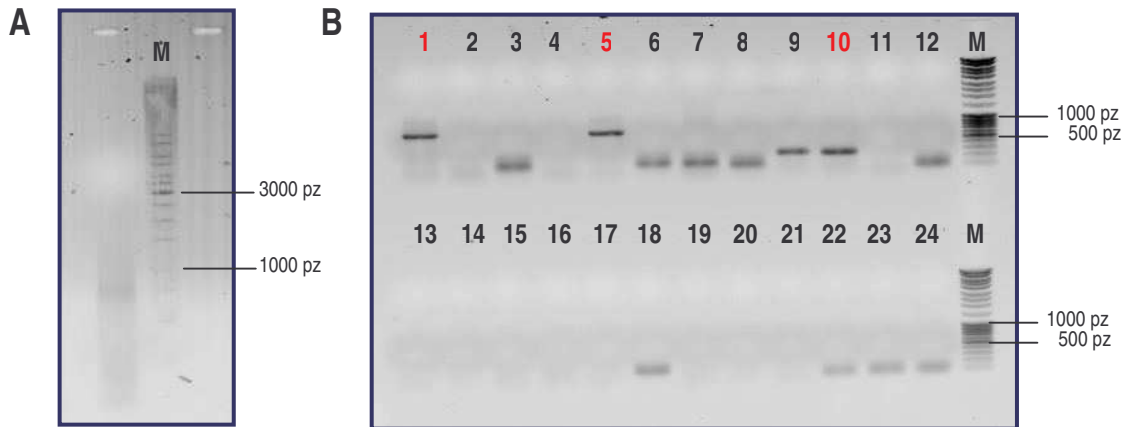
Zgrupowane w kontigu 3 sekwencje LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043 mają podobną długość (ok. 135 nt) i są zakończone ciągiem poli(A). Jednak, jak wskazuje analiza elektroforetyczna insertów (por. Rys. 10), klon LA02EST004 jest dużo dłuższy niż wskazywałaby uzyskana sekwencja (ok. 1000 pz). Dlatego przesekwencjonowano koniec 3' tego insertu używając startera LAVecR. Uzyskana sekwencja o długości ok. 600 nt wykazuje bardzo wysoką zgodność z leghemoglobiną I z łubinu żółtego oraz innymi roślinnymi leghemoglobinami, zarówno na poziomie DNA jak i białka (nie przedstawiono danych). Klon reprezentowany przez EST LA02EST004 jest

prawdopodobnie chimerą złożoną ze sklejonych ze sobą fragmentów cDNA dwóch różnych genów, ułożonych w tej samej orientacji (Rys. 35). Prawdopodobnie obecność fragmentu cDNA leghemoglobiny była przyczyną dużo wyższego poziomu indukcji obserwowanego w analizach makromacierzowych dla sondy LA02EST004 w porównaniu z pozostałymi sondami z kontigu 3 (por. Rys. 25). Ponieważ jednak do hybrydyzacji northern użyto sondę LA02EST043, symbiotyczna indukcja ekspresji genu reprezentowanego przez te trzy klony nie może budzić wątpliwości.



Rysunek 35. Schematyczne przedstawienie prawdopodobnej struktury chimerycznego insertu zawierającego EST LA02EST004 oraz fragment cDNA leghemoglobiny.

Nie dysponując dłuższymi fragmentami cDNA omawianego genu w bibliotece LA02 zdecydowano się zastosować technikę 5' RACE w celu ustalenia jego 5'-końcowej sekwencji. Na podstawie sekwencji z kontigu 3 zaprojektowano następujące specyficzne startery: 43RACE0 (starter I), 43RACE1 (starter II), 43RACE2 (starter III) i 43RACE3 (starter IV, por. punkt C.2.18). Ponieważ produkt reakcji PCR wykonanej przy pomocy uniwersalnego startera RACEFL oraz startera 43RACE1 był widoczny na żelu jako (nieco rozmyty) prążek (Rys. 36A), wklonowano go bez powtórnej amplifikacji do wektora plazmidowego pCR[®]2.1 i transformowano nim bakterie. Otrzymano kilkadziesiąt rekombinantów, których inserty plazmidowe amplifikowano przy pomocy starterów RACEFS i 43RACE2. Następnie sekwencjonowano trzy inserty (1, 5 i 10, Rys. 36B), stosując starter JP204. Otrzymane sekwencje cząstkowe oraz sekwencję kontigu 3 złożono, a sekwencji końcowej nadano roboczą nazwę LA02-043 (Rys. 37). Tłumaczenie sekwencji DNA na zapis aminokwasowy pozwoliło wyróżnić ORF o długości 306 nt, kodującą 101 aa, rozpoczynającą się od trzeciego nukleotydu sekwencji LA02-043.



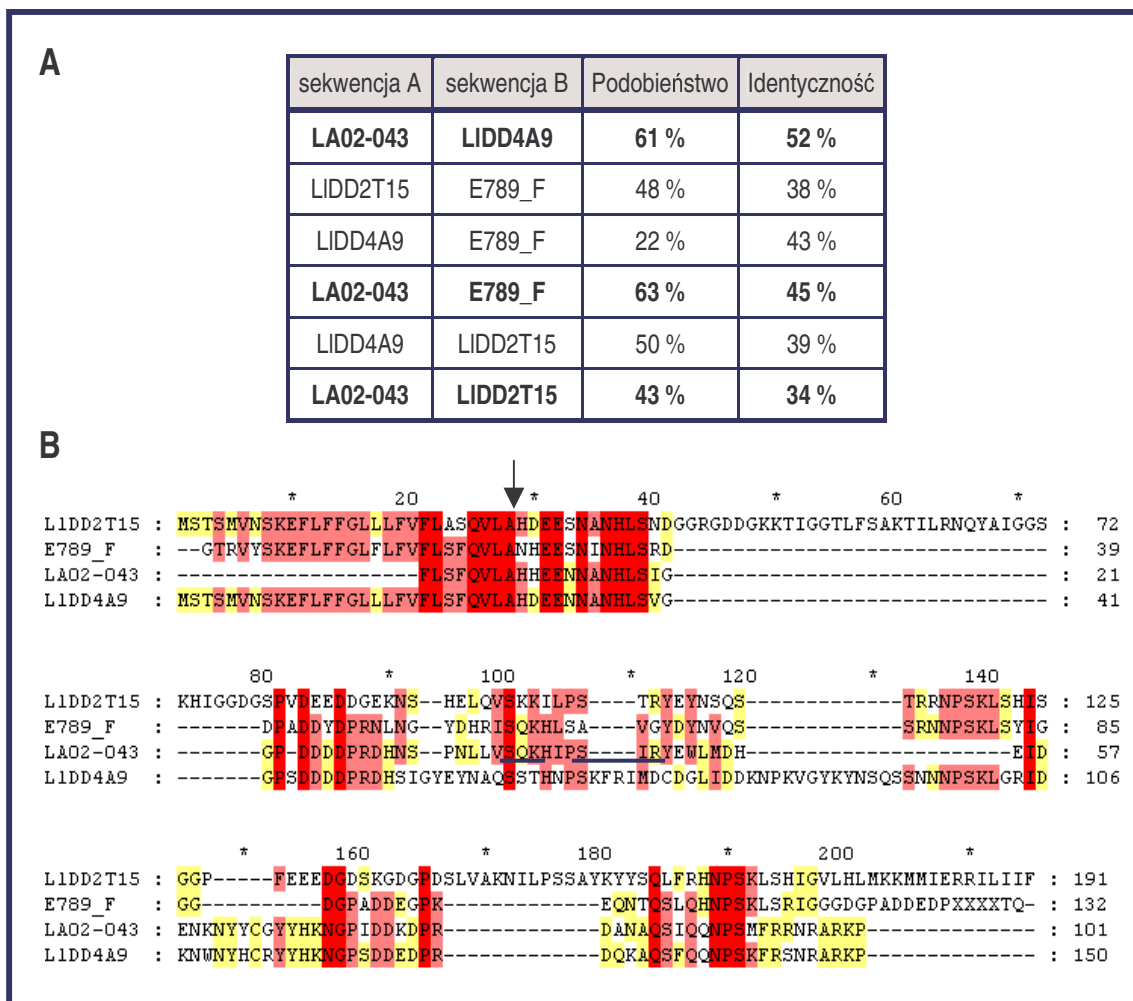
Rysunek. 36. Klonowanie końca 5' LA02-043. A. Produkt amplifikacji PCR ze starterami RACEFL i 43RACE1. B. Obraz prążków uzyskanych po amplifikacji insertów z otrzymanych po transformacji rekombinantów, ze starterami RACEFS i 43RACE2. Czerwonym kolorem zaznaczono zsekwencjonowane inserty, reprezentujące sekwencje końca 5' La02-043. M – marker masy cząsteczkowej.

Przeszukanie nukleotydowych i białkowych baz danych zaowocowało znalezieniem kilku sekwencji o znaczącym podobieństwie do LA02-043: cDNA LIDD4A9 z *L. luteus* - (numer identyfikacyjny AF139379), dwóch wariantów cDNA LIDD2T15, również z *L. luteus* (numery AF139380 i AF139381) oraz sekwencji EST E789_F z *L. albus* (numer CA411488). Wszystkie trzy sekwencje pochodzące z łubinu żółtego zostały zidentyfikowane wcześniej metodą selekcji różnicowej w 21-dniowych brodawkach symbiotycznych [Świdorski i wsp. 2000]. Różnice pomiędzy wariantami LIDD2T15 nie dotyczą otwartej ramki odczytu, a wyłącznie długości końca 3'UTR. Sekwencja EST E789_F pochodzi z biblioteki cDNA przygotowanej z korzeni łubinu białego z korzeniami proteoidalnymi w 7- i 10 dniu. Wynikowe pliki z przeszukania baz danych - „La02-043 blastx.htm”, „LA02-043 blastn.htm” oraz „LA02-043 blastn EST.htm” zamieszczono w folderze „Indywidualna analiza sekwencji” na dysku CD dołączonym do pracy.

Porównanie sekwencji przypuszczalnych produktów białkowych LA02-043, LIDD4A9, LIDD2T15 oraz E789_F wskazuje na ich niezwykle wysokie podobieństwo na odcinku kilkudziesięciu aminokwasów z końca N (Rys. 38). Sekwencja z łubinu wąskolistnego wykazuje najwyższe podobieństwo do LIDD4A9, a najmniejsze do LIDD2T15 (Rys.

insert5-	GTTTCCTATCTTTCCAAGTCTTGGCTCATCATGAAGAGAACAATGCTAATCATTGAGTA
consensus	GTTTCCTATCTTTCCAAGTCTTGGCTCATCATGAAGAGAACAATGCTAATCATTGAGTA F L S F Q V L A H H E E N N A N H L S I . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	TTGGTGGTCCAGATGATGACGATCCTAGAGATCATAATAGTCCCAATCTTCTAGTTTCAC
consensus	TTGGTGGTCCAGATGATGACGATCCTAGAGATCATAATAGTCCCAATCTTCTAGTTTCAC G G P D D D D P R D H N S P N L L V S Q . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	AAAAACACATACCTTCAATTTCGATATGAATGGCTGATGGATCATGAAATAGATGAAAATA
consensus	AAAAACACATACCTTCAATTTCGATATGAATGGCTGATGGATCATGAAATAGATGAAAATA K H I P S I R Y E W L M D H E I D E N K . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	AGAATTATTATTGTGGTTATTATCATAAAAAATGGTCCAATTGATGACAAGGATCCTAGGG
consensus	AGAATTATTATTGTGGTTATTATCATAAAAAATGGTCCAATTGATGACAAGGATCCTAGGG N Y Y C G Y Y H K N G P I D D K D P R D . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	ATGCGAATGCTCAATCAATTCAACAAAACCCATCAATGTTTCGTCGCAATCGAGCTAGAA
consensus	ATGCGAATGCTCAATCAATTCAACAAAACCCATCAATGTTTCGTCGCAATCGAGCTAGAA A N A Q S I Q Q N P S M F R R N R A R K . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	AGCCATGATAGCACAAA-GGCTACAAAAATGATAGGAAGACTTCGTCAGCATTTCATGAT
insert10-	AAAAGGCTACAAAAATGATAGGAAGACTTCGTCAGCATTTCATGAT
consensus	AGCCATGATAGCACAAAAGGCTACAAAAATGATAGGAAGACTTCGTCAGCATTTCATGAT P * . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	GAAAATTACTCCTACGACGAAGAAGGGTGAAAATTAAGTAATAATAATCCATTAGATATA
insert10-	GAAAATTACTCCTACGACGAAGAAGGGTGAAAATTAAGTAATAATAATCCATTAGATATA
consensus	GAAAATTACTCCTACGACGAAGAAGGGTGAAAATTAAGTAATAATAATCCATTAGATATA . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	AGTTATAATAATCCCATATATAGGGAAGGGAACACTTGTGCTGATAAATTAGCTTCTTTT
insert10-	AGTTATAATAATCCCATATATAGGGAAGGGAACACTTGTGCTGATAAATTAGCTTCTTTT
consensus	AGTTATAATAATCCCATATATAGGGAAGGGAACACTTGTGCTGATAAATTAGCTTCTTTT . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	GCAATTTGTTCTAGAATGTATACTTGGTGGGATGCTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAG
insert10-	GCAATTTGTTCTAGAATGTATACTTGGTGGGATGCTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAG
insert1-	GCAATTTGTTCTAGAATGTATACTTGGTGGGATGCTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAG
kontig03+	TACTTGGTGGGATGCTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAG
consensus	GCAATTTGTTCTAGAATGTATACTTGGTGGGATGCTTGCCTAGTTTCCTTTTGATTGAG . : . : . : . : . : . : . : . :
insert5-	TTCAATAGGAATAGGTTGTTTCTTCCTAACTATAGACTTAGGAACATGTAACC
insert10-	TTCAATAGGAATAGGTTGTTTCTTCCTAACTATAGACTTAGGAACATGTAACC
insert1-	TTCAATAGGAATAGGTTGTTTCTTCCTAACTATAGACTTAGGAACATGTAACC
kontig03+	TTCAATAGGAATAGGTTGTTTCTTCCTAACTATAGATTAGGAACATGTAACCTCTTCTT
consensus	TTCAATAGGAATAGGTTGTTTCTTCCTAACTATAGACTTAGGAACATGTAACCTCTTCTT . : . : . : . : . : . : . : . :
kontig03+	CTTCAATATATTGGGGTGTTCACCCAGCTTTAAAA
consensus	CTTCAATATATTGGGGTGTTCACCCAGCTTTAAAA

Rysunek 37. Złożenie sekwencji kontigu 3 i klonów utworzonych metodą 5' RACE oraz sekwencja aminokwasowa przewidywanego produktu białkowego.



Rysunek 38. Wynik porównania sekwencji aminokwasowych zakodowanych w LA02-043, LIDD4A9, LIDD2T15 i E789-F. A. Podobieństwo poszczególnych par sekwencji. B. Zestawienie sekwencji. Czarna strzałka obrazuje prawdopodobne miejsce odcięcia peptydu sygnałowego. Na niebiesko podkreślono miejsca fosforylacji w sekwencji LA02-043.

38A). W żadnej z sekwencji nie stwierdzono obecności konserwatywnych domen, nie znaleziono też innych homologów dla żadnej z nich. W sekwencji LA02-043 występują dwa miejsca fosforylacji (Rys. 38B). Dla trzech sekwencji o najdłuższych końcach N (LIDD4A9, LIDD2T15 i E789_F) wskazano możliwość występowania peptydów sygnałowych. Przewidywane miejsca cięcia znajdują się w odpowiadających sobie pozycjach, a sekwencja peptydów sygnałowych jest prawie identyczna (Rys. 38B). Wydaje się bardzo prawdopodobne, że podobny peptyd sygnałowy występuje także w LA02-043. Wskazuje na to 100 % zgodność początku sekwencji z ostatnimi ośmioma aminokwasami peptydów sygnałowych oraz odległe położenie pierwszej metioniny w otwartej ramce odczytu (pozycja 52 na Rys. 37), które sugeruje że cała ORF jest dłuższa, a jej kodon startowy znajduje się poza otrzymaną sekwencją, w kierunku 5'.

D.5.3. LA02EST028

Ustalona sekwencja klonu LA02EST028, dla którego wykazano indukcję ekspresji w dojrzałych brodawkach łubinu, ma 409 nt i jest zakończona łańcuchem poli(A). Długość prążka obserwowanego po amplifikacji i elektroforezie (Rys. 10) pokazuje, że jest to pełna sekwencja insertu. Przeszukanie białkowych baz danych zaowocowało przypisaniem mu kilku możliwych adnotacji funkcjonalnych. Wśród znalezionych białek najwyższą homologię wykazały sekwencje opisywane jako uniwersalne białka stresu (USP, ang. *universal stress protein*) oraz białka wrażliwe na etylen (ER, ang. *ethylene responsive*). Były to sekwencje pochodzące z roślin niemotylkowatych, głównie *A. thaliana* i *O. sativa*, a także sekwencje bakteryjne. Białka te zawierają domenę USPA, której fragment znaleziono także w dedukowanej sekwencji białkowej LA02EST028 (podobieństwo do domen cd00293, pfam00582, COG0589 z bazy CDD). Jedyna białkowa sekwencja o znaczącym podobieństwie, która pochodzi z rośliny motylkowatej to wiążące ATP białko ENOD18 z *V. faba*, również zawierające domenę USPA. Pozycje aminokwasowe zaangażowane w tworzenie miejsca wiązania ATP są zachowane również w sekwencji LA02EST028 (Rys. 40).

W bazach sekwencji nukleotydowych, w tym w bazach EST, znaleziono dużą liczbę homologicznych do LA02EST028 sekwencji z innych roślin motylkowatych. Pochodzą one z różnych tkanek, zarówno symbiotycznych jak i niesymbiotycznych (por. plik wynikowy LA02EST043 blastn EST.htm umieszczony w folderze „Indywidualna analiza sekwencji”, na dysku CD dołączonym do pracy). Co jest interesujące, przeprowadzone przeszukania wykazały bardzo istotne podobieństwo klonu LA02EST028 do nukleotydowej sekwencji LIDD2A18 (numer identyfikacyjny AF139378), wyizolowanej z biblioteki cDNA z brodawek z łubinu żółtego (por. Rys.39), podczas gdy przeszukanie bazy białek nie wykazało takiego podobieństwa. Szczegółowa analiza dedukowanych produktów translacji LA02EST028 oraz LIDD2A18 potwierdza pokrewieństwo obu sekwencji. Wynika z niej również, że zdeponowana w GenBank-u sekwencja cDNA LIDD2A18 (numer identyfikacyjny AAD28288) może zawierać kilka błędów które spowodowały kilkakrotne przesunięcie ramki odczytu, a przez to nie odczytano całej sekwencji kodującej białko. Z tego powodu prawdopodobnie niepełna sekwencja białkowa LIDD2A18 nie wykazała dostatecznej homologii do produktu translacji LA02EST028. Rys. 40 przedstawia

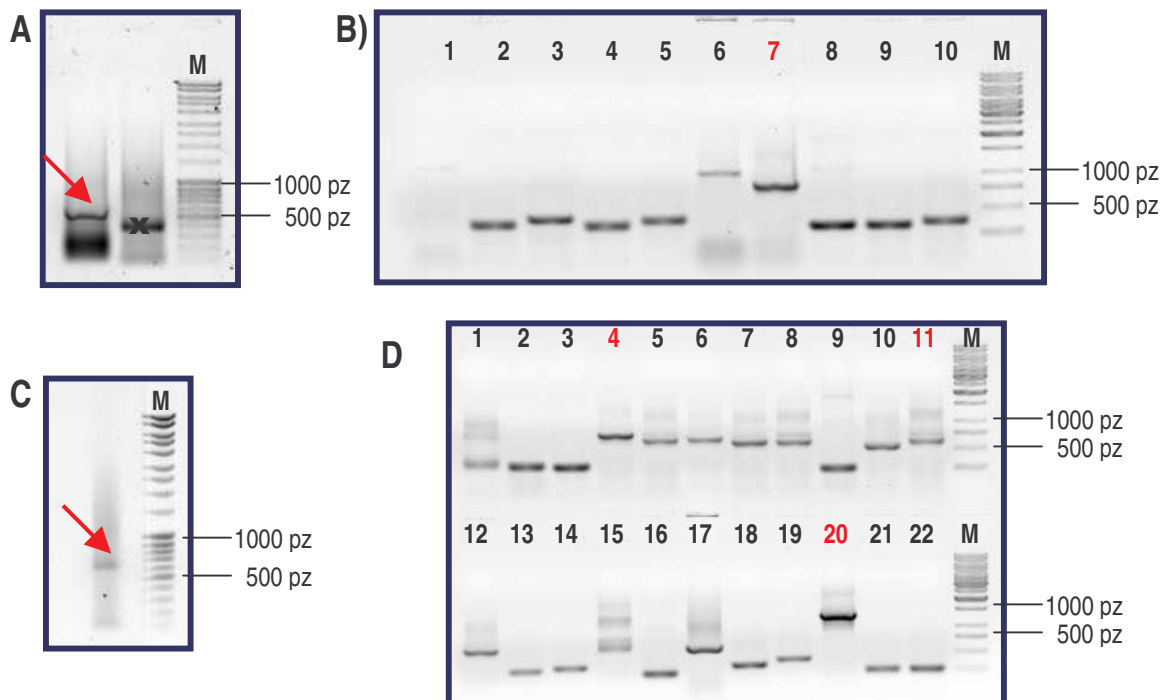
porównanie dedukowanych produktów translacji LA02EST028 i LIDD2A18, uwzględniających możliwe przesunięcia ramek odczytu, z homologicznymi białkami oraz sekwencjami EST z roślin motylkowatych.

LA02EST028	:	-----	:	-
LIDD2A18	:	TGGCACGAGAGAAAAGGCAGTAATGGTGTTAGCCATAGATGAGCATGAGCATAGTAGCTA	:	60
		* 20 * 40 * 60		
LA02EST028	:	-----	:	-
LIDD2A18	:	TGCATTGGGGTGGACTCTAGACCGTTTCTTCACTCCTTTTGGGTCAGATGCTCCTTTCAA	:	120
		* 80 * 100 * 120		
LA02EST028	:	-----	:	-
LIDD2A18	:	ACTCGTCCTTGCAATGCCAAATCCTCCTCCTGTTGCAGTTAGTATGGCTGGACCTGG	:	180
		* 140 * 160 * 180		
LA02EST028	:	-----	:	-
LIDD2A18	:	GGCTCTTGGAACTGAATTTTCCCATCAGTTGAGGTGCAACTAAA	:	240
		* 200 * 220 * 240		
LA02EST028	:	-----	:	15
LIDD2A18	:	GCAGCTTGCTGATCA	:	240
		* 260 * 280 * 300		
LA02EST028	:	A- TTACAGAAAAAGCTAGGCAAATTTGTGCCAGTAAATTGGTTCATGAGGTGGCAGTGG	:	74
LIDD2A18	:	AATTACAGAAAAAGCTAGGCAAATTTGTGCCAGTAAATTGGTTAATGAGGTGGAAAGTGG	:	300
		* 320 * 340 * 360		
LA02EST028	:	AGTGATTGAAGGTGATGCTAGGAATGTGCTGTGTGATGCTGTAGAAAAGACATCAGGCATC	:	134
LIDD2A18	:	AGTGATTGAAG-TGATGGTAGAAATGTGCTGTGTGATGCTGTAGAAAAGACATCAAGGCATC	:	359
		* 380 * 400 * 420		
LA02EST028	:	AGTATTGGTTTTGGGTAGCCATGGATATGGAGCTATCAAAAAGAGCTGTTATAGGAAGTGT	:	194
LIDD2A18	:	AGTATTGGTTTTGGGTAGCCATGGATATGGAGTTATCAAAAAGAGCTGTTATAG-AAAGTGT	:	418
		* 440 * 460 * 480		
LA02EST028	:	AAGTGACCATTGTGCTCATCATGCTCGTTGTTCTGTGATGATT----GTGAAGAAGCCCA	:	250
LIDD2A18	:	GAGTGACCATTGTGCTCATCATGCTCGTTGTTCCGGTGATGATGATTGGTGAAGAAGCCCA	:	478
		* 500 * 520 * 540		
LA02EST028	:	AGATCAAACGTTAA-GCTGCTCCATACAACCTCATTATAAATAATTATGCATGTATGAAA	:	309
LIDD2A18	:	AGATCAAACGTTAAAGCTGCTCCATCTCATCTCAT-ATAAATAATTATC-ATATATGAAA	:	536
		* 560 * 580 * 600		
LA02EST028	:	ACTTAATTTTAATTTGAGATGTAACCTCGTCAACTTTATTGCATATTGGCATATTC-----	:	364
LIDD2A18	:	ACTTCATTTTAATTTGAGATGTAACCTCCTCAACTTTATTTCATATTGCCATATTCACGTG	:	596
		* 620 * 640 *		
LA02EST028	:	---GAGTCATCTTACTACGTCAGATAATACTTATCACATGTTAGAAA-----	:	409
LIDD2A18	:	TATGAATCATCTTACTACGTCAGTTAAT-CTTATTACATGTC-AAAAAAAAAAAAAA	:	650

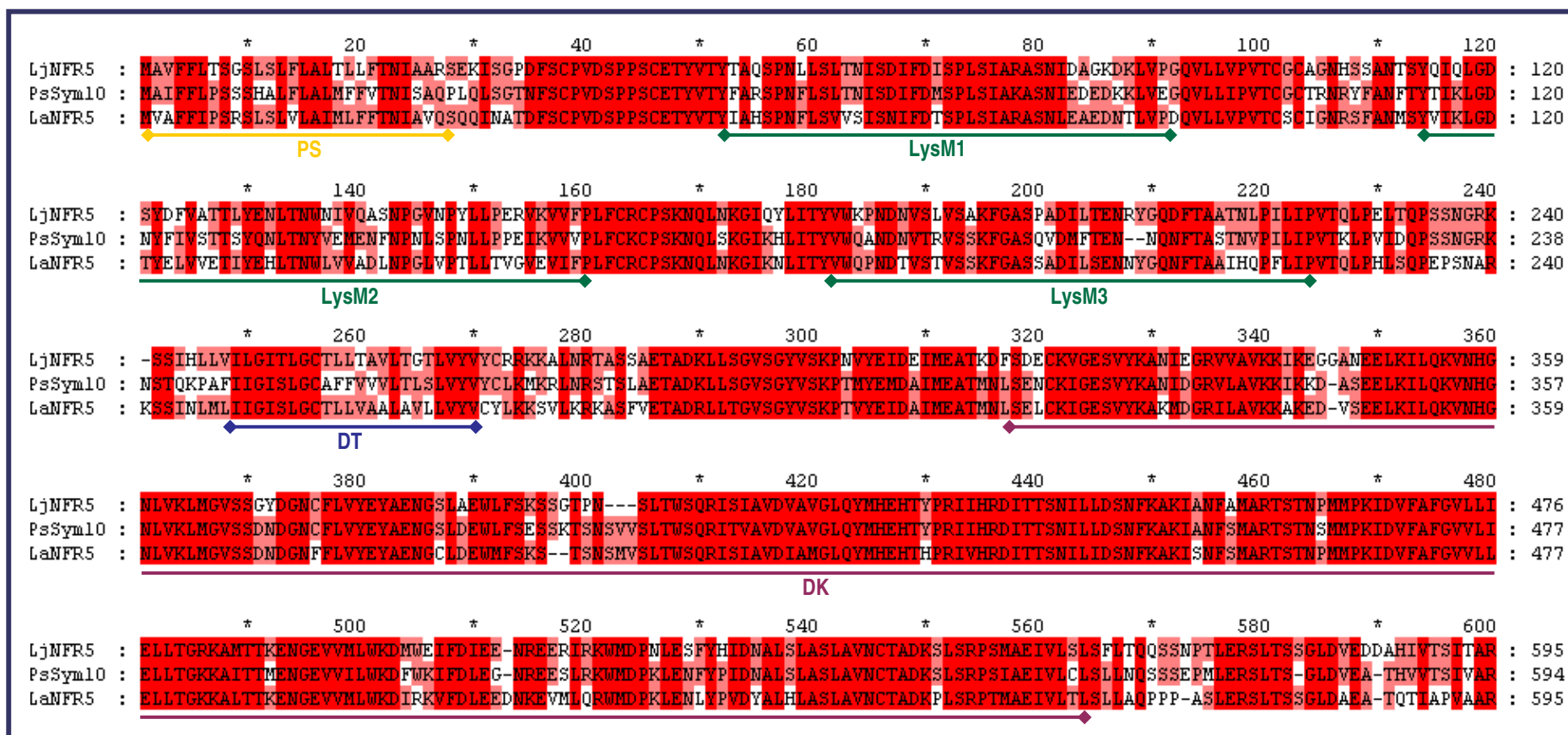
Rysunek. 39. Porównanie nukleotydowych sekwencji LA02EST028 z łubinu wąskolistnego oraz LIDD2A18 z łubinu żółtego

uzyskanego z korzeni łubinu wąskolistnego. Stosowano uniwersalny starter JP207, komplementarny do łańcucha poli(A), zawierający na końcu 3' sekwencję adapterową. Uzyskany ss cDNA po oczyszczeniu posłużył jako matryca do amplifikacji PCR ze starterem JP205, komplementarnym do sekwencji adapterowej oraz specyficznym starterem 225F, zaprojektowanym na podstawie sklonowanego wcześniej odcinka LA10SEQ090. Otrzymany produkt o długości ok. 600 nt (Rys 41A) oczyszczono z żelu i wligowano do wektora pCR[®]2.1, którym transformowano komórki kompetentne. W wyniku sekwencjonowania uzyskanych transformantów otrzymano sekwencję końca 3' cDNA *NFR5* (Rys.41B).

Przy ustalaniu końca 5' wykorzystano startery *NFR5-R5* (starter I) oraz *NFR5-R6* (starter II). Już w pierwszej reakcji PCR po dobudowaniu łańcucha poli(dA) otrzymano wyraźny prążek o długości ok. 650 nt (Rys. 41C). Po ligacji produktu do wektora i transformacji komórek *E. coli* wyrosło kilkadziesiąt rekombinantów (Rys. 41D). Zsekwencjonowano najdłuższe z nich, otrzymując w rezultacie sekwencję końca 5' cDNA *NFR5*.



Rysunek 41. Ustalanie sekwencji cDNA *LaNFR5*. 3' RACE (A - amplifikacja końca 3' i B - analiza transformantów) oraz 5' RACE (C - amplifikacja końca 5' i D - analiza transformantów). Do amplifikacji insertów (B i D) użyto pary uniwersalnych starterów JP203 i JP204. Strzałkami zaznaczono oczekiwane produkty amplifikacji. Czerwonym kolorem oznaczono inserty, których sekwencje odpowiadały poszukiwanym końcom cDNA. M – marker długości DNA.



Rysunek 42. Porównanie sekwencji aminokwasowych LaNFR5, NFR5 (*L. japonicus*, CAE02598) i Sym10 (*P. sativum*, CAE02594). Kolorowymi liniami zaznaczono znalezione domeny i motywy: PS – peptyd sygnałny; LysM – motyw LysM; DT – domena transbłonowa; PK – domena kinazowa

Sekwencja DNA utworzona przez złożenie LA10SEQ090 razem z sekwencjami końców 3' i 5' wynosi 2088 nt. Zakodowana w niej otwarta ramka odczytu ma długość 595 aa. Otaczające ją sekwencje 5' UTR i 3' UTR wynoszą odpowiednio: 66 nt i 237 nt. Porównanie sekwencji białka łubinowego nazwanego LaNFR5 (*Lupinus angustifolius* NFR5) z białkami NFR5 z *L. japonicus* i SYM10 z *P. sativum* przedstawiono na Rys. 42. Sekwencje wykazują ok. 70 % identyczności. Podobnie jak w poznanych wcześniej receptorach *Lotus* i grochu, w białku LaNFR5 wyróżnić można peptyd sygnałny oraz domenę transmembranową. W domenie zewnątrzkomórkowej wyróżnić można trzy motywy typu LysM, które, jak się wydaje, są odpowiedzialne za wiązanie bakteryjnych czynników Nod [Limpens i wsp. 2003; Madsen i wsp. 2003; Radutoiu i wsp. 2003]. Ten region wykazuje jednocześnie największą zmienność sekwencji.

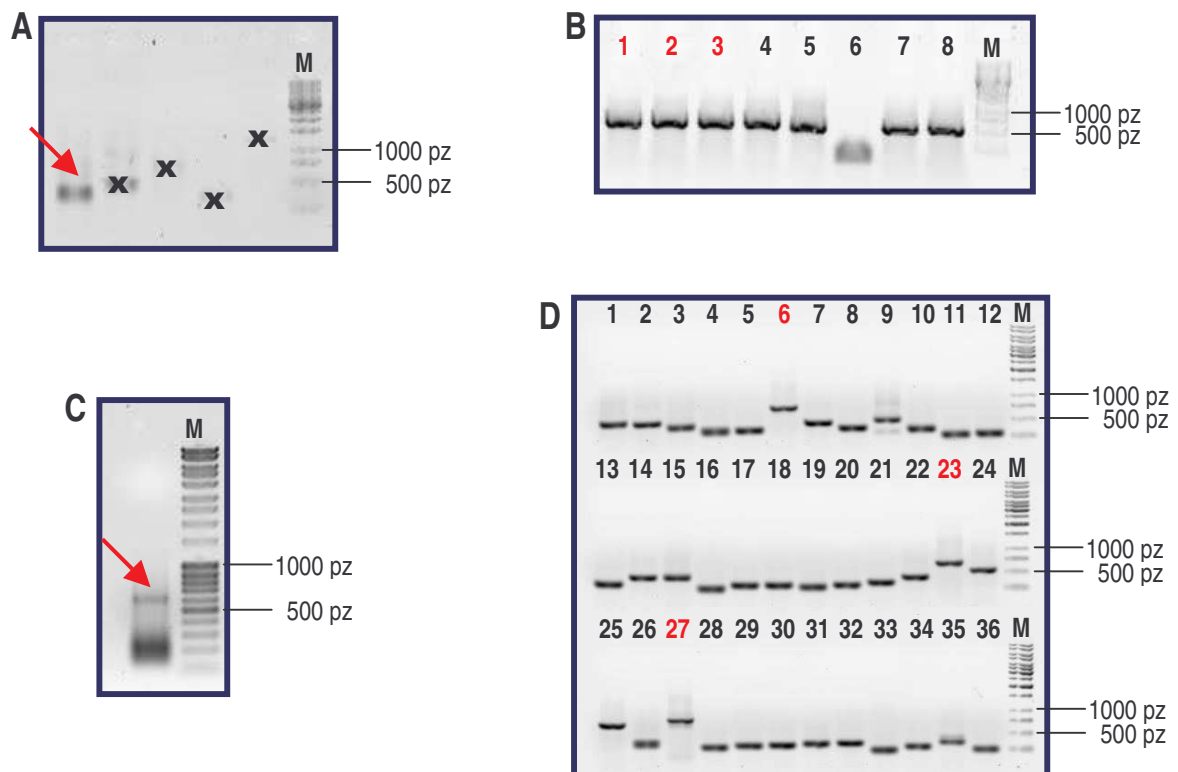
Profilowanie ekspresji genu *LaNFR5* przeprowadzone z zastosowaniem makromacierzy cDNA (por. podrozdział D.4) nie wykazało zmian w ekspresji genu w odpowiedzi na obecność bakterii symbiotycznych i rozwój brodawek korzeniowych w drugiej serii analiz (w pierwszej serii sygnał pochodzący od sondy LA10SEQ090 był poniżej progu detekcji). Analizę ekspresji genu *LaNFR5* powtórzono stosując technikę northern. Eksperyment przeprowadzono w analogiczny sposób jak doświadczenia opisane w punkcie D.4.3 i analizowano identyczny materiał biologiczny: korzenie nieinfekowane, infekowane korzenie z brodawkami, korzenie roślin hodowanych w warunkach głodu azotowego, liście, nasiona. Jednak mimo bardzo wysokiego poziomu wyznakowania sondy (uzyskanej na matrycy klonu LA10SEQ090) nie udało się zaobserwować sygnału w żadnej z badanych prób (nie przedstawiono danych).

D.5.5. LA02SEQ091

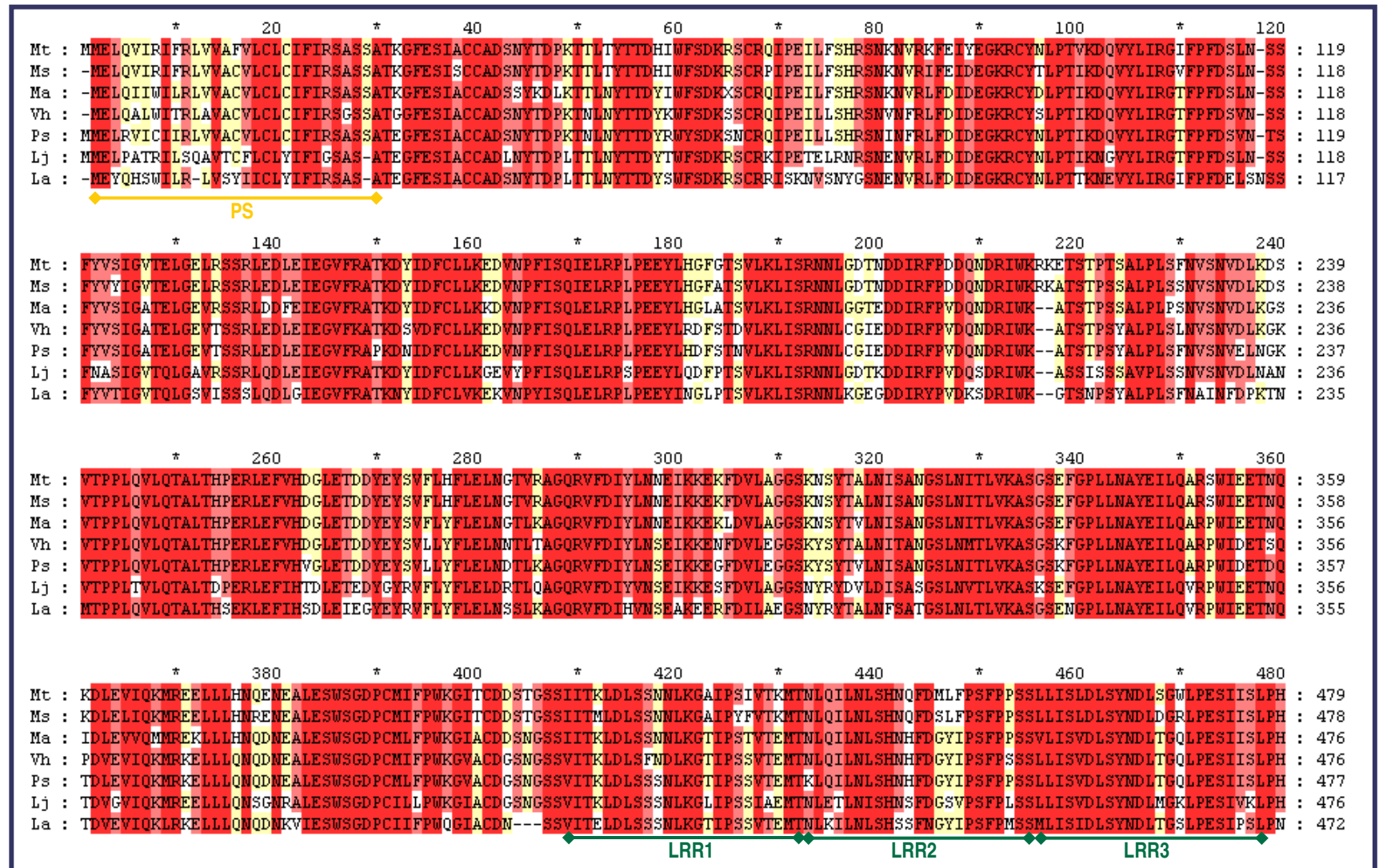
Wykorzystując otrzymany wcześniej fragment cDNA łubinowego homologu genu *SYMRK* (LA10SEQ091) zaprojektowano specyficzne startery do uzyskania końców 3' i 5' transkryptu. Przy amplifikacji końca 3' zastosowano taką samą technikę jak dla genu *LaNFR5*, tj. uzyskano jednoniciowy cDNA na matrycy RNA z korzeni, a następnie przeprowadzono amplifikację PCR przy użyciu starterów: uniwersalnego JP205 oraz specyficznego 2072F. Uzyskany produkt (Rys. 43A) ligowano do wektora pCR[®]2.1,

którym transformowano komórki kompetentne. W wyniku sekwencjonowania uzyskanych transformantów otrzymano trzy nieznacznie różniące się warianty końca 3' cDNA (Rys. 43B). Do złożenia sekwencji wybrano najdłuższy z nich.

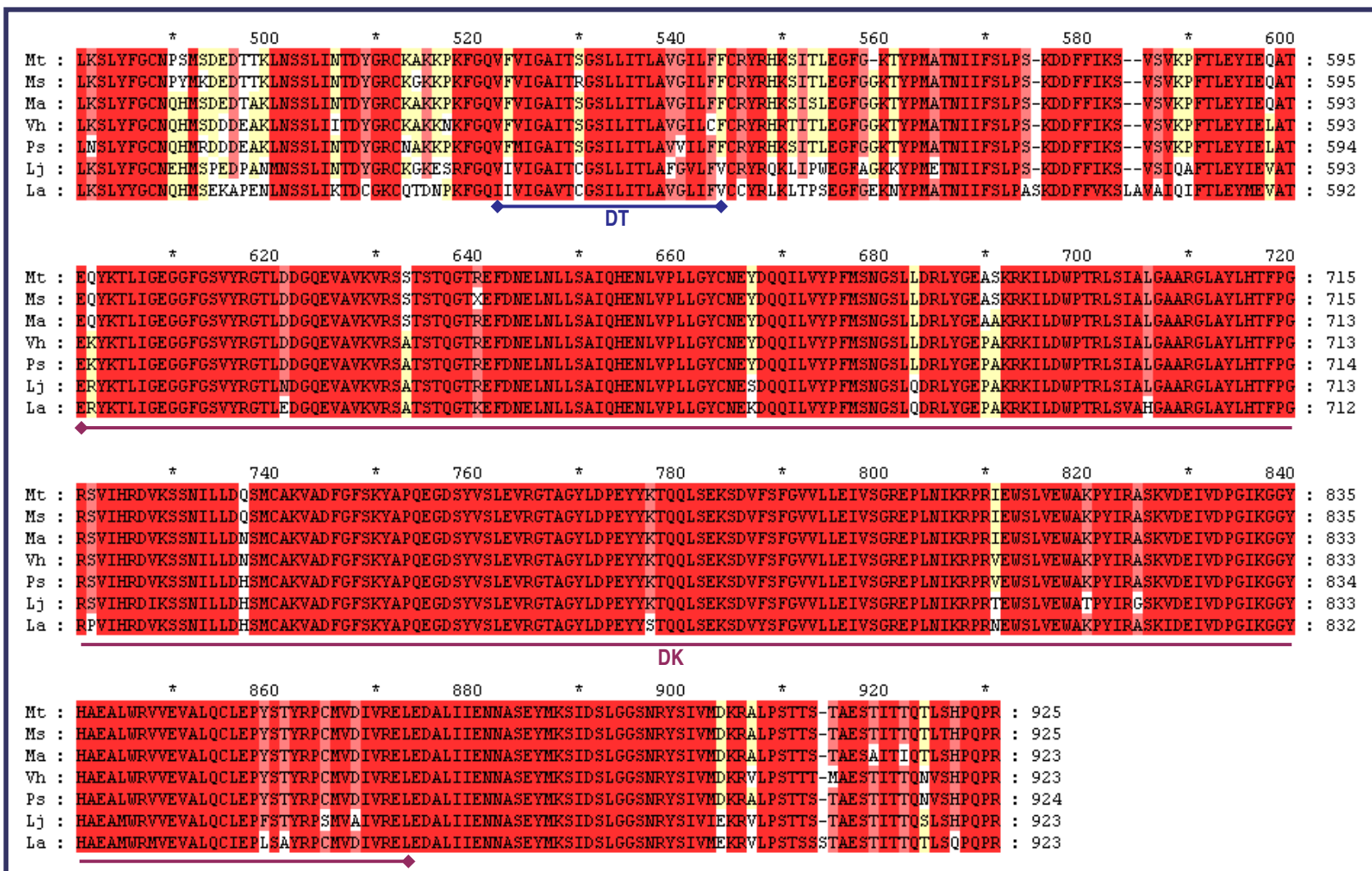
Następnie zastosowano technikę 5' RACE do ustalenia sekwencji końca 5'. Wykorzystano w tym celu specyficzne startery SYMRK-R1 (starter I), SYMRK-R2 (starter II) oraz SYMRK-R4 (starter IV). Po ligacji do wektora produktu otrzymanego w wyniku końcowej amplifikacji i transformacji komórek *E. coli* przeanalizowano kilkadziesiąt transformantów (Rys. 43C i D). Zsekwencjonowano kilka najdłuższych insertów i otrzymano w rezultacie sekwencję końca 5' cDNA. Po złożeniu uzyskanych sekwencji z sekwencją LA10SEQ091 uzyskano cDNA o długości 3274 pz. Zawiera ona ORF o długości 923 aminokwasów, oflankowaną regionami 5' UTR (338 nt) i 3' UTR (167 nt).



Rysunek 43. Ustalanie sekwencji cDNA *LaSYMRK*. 3' RACE (A - amplifikacja końca 3' i B - analiza transformantów) oraz 5' RACE (C - amplifikacja końca 5' i D - analiza transformantów). Do amplifikacji insertów (B i D) użyto pary uniwersalnych starterów JP203 i JP204. Strzałkami zaznaczono żądane produkty amplifikacji. Czerwonym kolorem oznaczono inserty, których sekwencje odpowiadały poszukiwanym końcom cDNA. M – marker długości DNA.



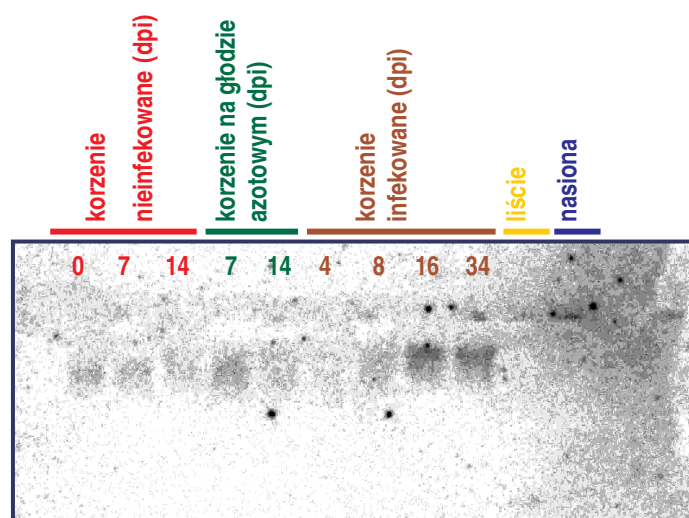
Rysunek 44. Porównanie sekwencji aminokwasowych LaSYMRC i innych roślin motylkowatych. Kolorowymi liniami zaznaczono miejsce występowania charakterystycznych motywów i domen: PS – peptyd sygnałny, LRR – powtórzenie bogate w leucynę, DT – domena transbłonowa, DK – domena kinazowa



Rysunek 44. Porównanie sekwencji aminokwasowych LaSYMRK i innych roślin motylkowatych cd.

Sekwencję aminokwasową LaSYMRK (*Lupinus angustifolius* SYMRK) porównano z homologicznymi sekwencjami innych roślin motylkowatych: *Lotus japonicus* (AAM67418), *Vicia hirsuta* (CAD22012), *Pisum sativum* (AAM76684), *Melilotus alba* (CAD22013), *Medicago truncatula* (AAM76685) i *Medicago sativa* (CAD10807, Rys. 44). Wykazują one 77 – 80 % identyczności (87 – 90% podobieństwa) do białka łubinowego. LaSYMRK jest najprawdopodobniej kotwiczony w błonie komórkowej (posiada peptyd sygnałny i domenę transbłonową). W swojej zewnątrzkomórkowej części posiada trzy powtórzenia typu LRR, a w części wewnątrzkomórkowej znajduje się domena kinazowa. LaSYMRK reprezentuje zatem typową budowę białka kinazy typu receptora, podobnie jak jego ortologi z innych roślin.

Mimo, że analiza ekspresji genu *LaSYMRK* przy pomocy makromacierzy DNA nie wykazała różnicowej ekspresji tego genu w brodawkach, przeprowadzono powtórne profilowanie ekspresji stosując metodę northern. Jednocześnie zbadano jego poziom w liściach i nasionach oraz wpływ niedoboru przyswajalnych form azotu na ekspresję w korzeniach (w identyczny sposób jak opisano w punkcie D.4.3). Badanie wykazało, że poziom transkrypcji genu *LaSYMRK* w łubinie utrzymuje się na niskim, ale stałym poziomie w korzeniach i nie zmienia się w warunkach głodu azotowego. Natomiast w trakcie symbiozy ekspresja genu wyraźnie rośnie, osiągając najwyższy poziom w dojrzałych brodawkach, 16- i 34 dpi. Nie wykryto ekspresji genu w liściach ani nasionach (Rys. 45).



Rysunek 45. Analiza northern ekspresji genu *LaSYMRK* w łubinie.

D.6. Analiza filogenetyczna genu *NFR5* w łubinach

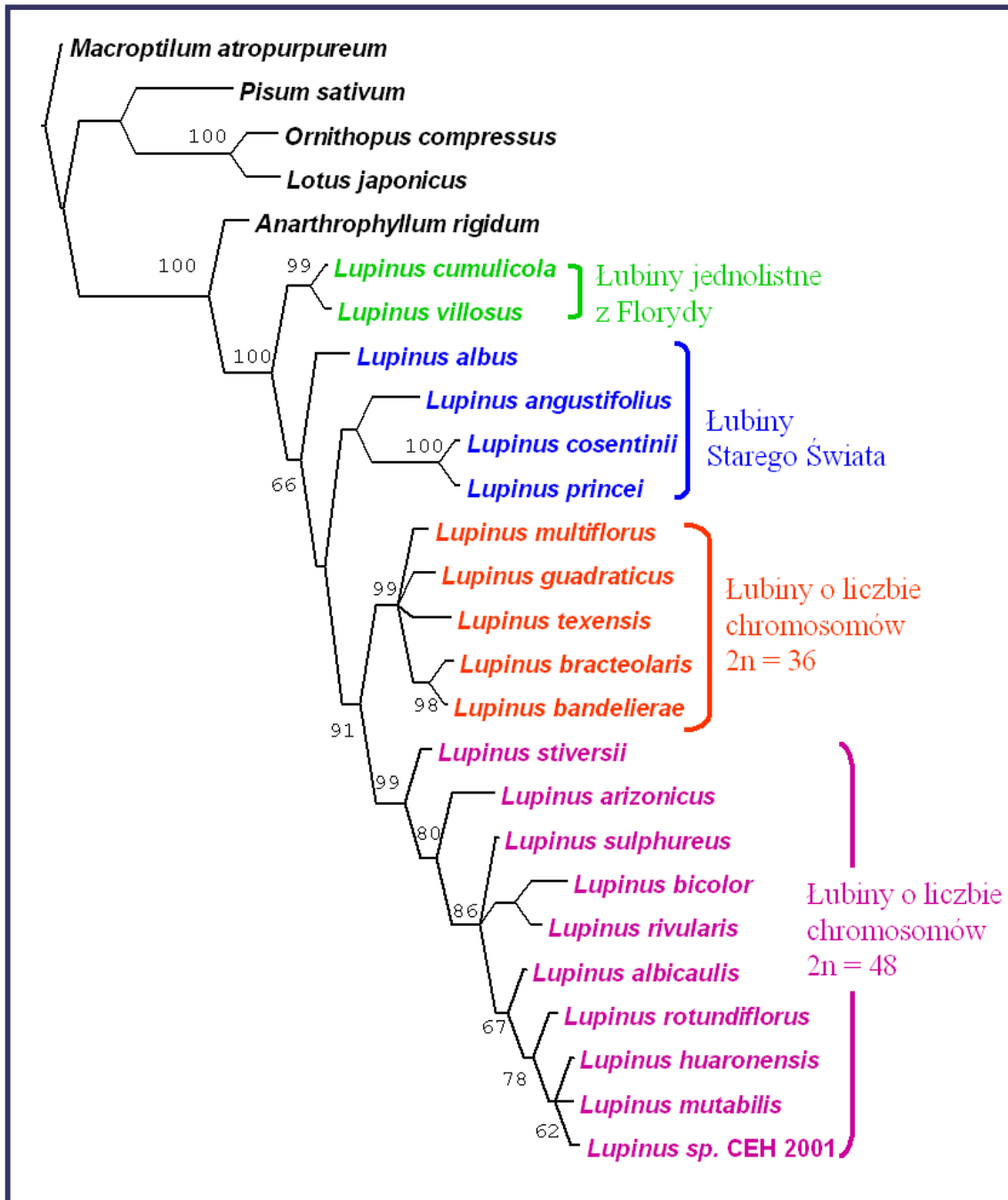
Celem tej części pracy było zastosowanie markera filogenetycznego w badaniach łubinu w oparciu o sekwencje genu *NFR5*, a następnie porównanie go z istniejącym podziałem filogenetycznym opartym o markery niesymbiotyczne. W tym celu amplifikowano fragmenty domeny receptorowej *nfr5* z różnych gatunków łubinów, a także z kilku pokrewnych gatunków, a po ustaleniu ich sekwencji – przeprowadzono analizę filogenetyczną.

D.6.1. Izolacja genomowego DNA i sekwencjonowanie domeny receptorowej

Wykorzystując zachowawczość sekwencji cDNA genu *NFR5* zaprojektowano parę starterów do amplifikacji: TSNFR5F4 i TSNFR5R4. Obejmują one region o długości około 830 nt, kodujący prawie całą zewnątrzkomórkową domenę oraz domenę transbłonową białka. W amplifikowanym odcinku zawierają się wszystkie trzy motywy LysM, prawdopodobnie zaangażowane bezpośrednio w wiązanie bakteryjnego czynnika Nod. Amplifikację prowadzono na matrycy genomowych DNA wyizolowanych z siewek lub liści odpowiednich roślin. Oparto się przy tym na założeniu, że podobnie jak ich ortologi w *L. japonicus* i *P. sativum*, łubinowe geny *NFR5* nie posiadają intronów [Madsen i wsp. 2003]. W rezultacie uzyskano częściowe sekwencje genów *NFR5* dwudziestu gatunków łubinów. Dodatkowo uzyskano fragmenty *NFR5* z *Anarthrophyllum rigidum*, reprezentującego wcześniej wyodrębniająca się linię filogenetyczną w obrębie Genisteae, oraz z *Macroptilium atropurpureum* reprezentującego plemię Phaseolae i *Ornithopus compressus* z plemienia Loteae.

D.6.2. Drzewo filogenetyczne *NFR5*

Otrzymane sekwencje, wraz z sekwencjami LaNFR5, NFR5 i SYM10 wykorzystano do konstrukcji drzewa filogenetycznego (Rys. 46). Zostało ono skonstruowane przez C.E. Hughes'a i E. Redwood (Department of Plant Sciences, University of Oxford, Wielka Brytania), za pomocą metody maksymalnej parsymonii.

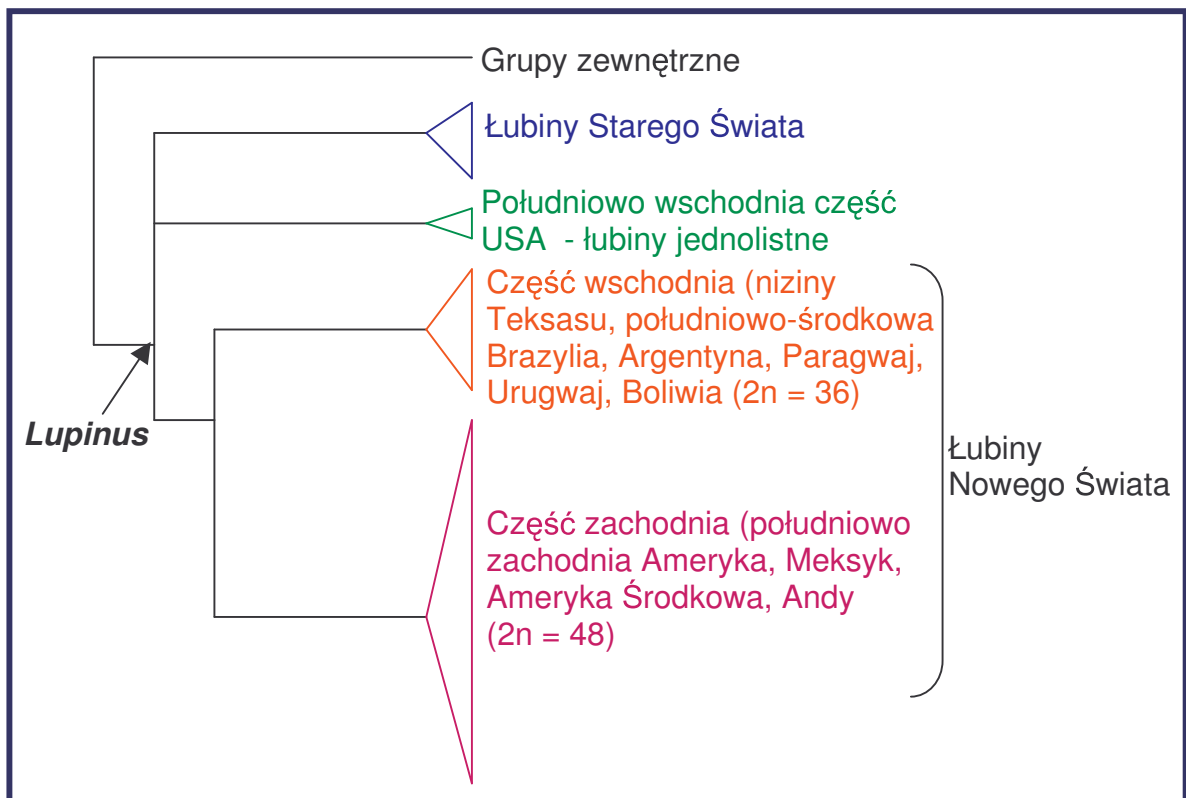


Rysunek 46. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Lupinus* utworzone w oparciu o symbiotyczny marker *NFR5*.

Topologia uzyskanego drzewa odpowiada zasadniczo filogenezie łubinów ustalonej na podstawie markerów niesymbiotycznych (Rys. 47) [Ainouche i Bayer 1999, Fukuda i wsp. 2003]. Zgodnie z dotychczasowymi danymi filogenetycznymi, *A. rigidum* zajmuje na drzewie *NFR5* pozycję zewnętrzną względem łubinów, a *O. compressus* wykazuje filogenetyczne pokrewieństwo z *L. japonicus*. Zarówno markery niesymbiotyczne jak i *NFR5* pozwalają zaobserwować wyraźny podział gatunków z rodzaju *Lupinus* na cztery główne grupy filogenetyczne:

- jednoliste łubiny pochodzące z Florydy;
- łubiny Starego Świata;
- łubiny Nowego Świata o diploidalnej liczbie chromosomów $2n = 36$, pochodzące ze środkowej części Stanów Zjednoczonych (Teksas) oraz wschodniej Brazylii;
- łubiny Nowego Świata występujące na terenach zachodnich Ameryki Północnej i Południowej (wzdłuż pasma Gór Skalistych i Andów), o diploidalnej liczbie chromosomów $2n = 48$.

Jedyna obserwowana różnica dotyczy położenia łubinów Starego Świata i łubinów jednolistnych: na drzewie *NFR5* ta ostatnia grupa jest położona zewnątrz, odwrotnie niż na drzewach niesymbiotycznych.



Rysunek 47. Topologia drzewa filogenetycznego rodzaju *Lupinus* opartego o markery niesymbiotyczne.

E. DYSKUSJA

Intensywne prace nad ustaleniem kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za ustanowienie symbiozy roślin motylkowatych z rizobiami trwają już od kilkudziesięciu lat. Cennych informacji na temat rozwoju brodawek korzeniowych dostarczają analizy transkryptomów roślinnych, przy czym wiele z nich skupia się na roślinach modelowych – *M. truncatula* i *L. japonicus*. Małe rozmiary genomów tych roślin oraz szeroki wachlarz dostępnych narzędzi molekularnych przyczyniły się do ogromnego postępu w badaniach nad symbiotycznym wiązaniem azotu. Jednak motylkowate, będące trzecią co do wielkości rodziną nasiennych [Lewis i wsp. 2003, Doyle i Luckow 2003] wykazują się znacznym zróżnicowaniem jeśli chodzi o szczegóły symbiozy (sposób infekcji, budowa brodawek korzeniowych, obecność lub brak symbiosomów, reakcja na fitohormony itp.). Stąd analiza roślin użytkowych jest cennym i niezbędnym uzupełnieniem tych badań. Łubiny, mimo że ich rola użytkowa jest obecnie dużo mniejsza niż w ubiegłych stuleciach, są w dalszym ciągu uprawiane między innymi na terenie Australii i Polski, głównie jako rośliny paszowe. Ponadto zjawisko brodawkowania u łubinów cechuje szereg unikalnych własności, które odzwierciedlają wczesne oddzielenie się plemienia Genistae od wspólnej linii motylkowatych. Jego badanie może stanowić ważne źródło informacji o kształtowaniu się zdolności roślin do symbiotycznych oddziaływań ze zdolnymi do przyswajania azotu atmosferycznego rizobiami.

E.1. Identyfikacja genów zaangażowanych w symbiotyczne wiązanie azotu w łubinie

E.1.1. Skuteczność zastosowanej metody selekcji

Przeciętna komórka eukariotyczna zawiera około 100 tysięcy transkryptów reprezentujących od 15 do 30 tysięcy różnych rodzajów mRNA [Wan i wsp. 1996]. Większość to tzw. rzadkie mRNA, reprezentowane przez jedną do kilkudziesięciu cząsteczek. Z kolei mRNA syntetyzowane najintensywniej (nawet w tysiącach kopii na komórkę) stanowią około 50 % masy transkryptomu, choć reprezentują zaledwie 1 % wszystkich rodzajów mRNA w komórce. Z tego powodu prawdopodobieństwo

wyłowienia niskoreprezentowanych transkryptów z tradycyjnych bibliotek cDNA jest stosunkowo niskie. Tymczasem często pełnią one kluczowe role regulacyjne w wybranych procesach komórkowych. W prezentowanej pracy źródłem sekwencji cDNA była znormalizowana biblioteka uzyskana z infekowanych korzeni łubinu w różnych stadiach symbiozy (7-, 14- i 21 dni po inokulacji bradyrizobiami). Dzięki procesowi normalizacji różnice pomiędzy stężeniami cDNA wysoko- i nisko reprezentowanych transkryptów w bibliotece zostały zmniejszone co najmniej kilkudziesięciokrotnie [Kisiel i wsp. 2004]. Podniosło to szanse na wyłowienie w trakcie przeszukania rzadkich, ciekawych cDNA, a przede wszystkim zwiększyło różnorodność wyjściowej puli rekombinantów.

W celu identyfikacji genów zaangażowanych w symbiotyczne oddziaływania z bakteriami wiążącymi azot, zastosowano strategię analizy różnicowej. Wyselekcjonowano wstępnie zestaw genów nie ulegających ekspresji w korzeniach łubinu bądź wyrażanych jedynie na bardzo niskim poziomie. Oparto się przy tym na założeniu, że brak detekcji transkryptów w nieinfekowanych korzeniach może wynikać z ich specyficznej ekspresji w tkankach symbiotycznych, ponieważ bibliotekę cDNA uzyskano z fragmentów korzeni z brodawkami. Następny etap selekcji polegał na identyfikacji klonów ulegających różnicowej ekspresji w korzeniach i 34-dniowych brodawkach. W efekcie, spośród około 5000 rekombinantów wyłoniono 90 klonów, potencjalnie biorących udział w symbiozie. Ponieważ na ostatnim, III etapie analizy różnicowej zbadano tylko 54,6 % wyselekcjonowanych cDNA, można się spodziewać, że analiza całej puli kandydatów zaowocowałoby uzyskaniem ponad 160 klonów wykazujących różnicową ekspresję. Zatem wydajność zastosowanej metody przeszukania wynosi 3,3 %. Wartość ta jednak zależy przede wszystkim od wyjściowej puli rekombinantów oraz odpowiedniego dobrania prób cDNA do analizy różnicowej. Stąd, aby określić użyteczność zastosowanej metody selekcji, porównano jej wyniki z danymi na temat podobnych projektów analizy transkryptomów roślinnych w symbiozie.

Stosując strategię zbliżoną do opisaną przy identyfikacji genów zaangażowanych w tworzenie spontanicznych brodawek u *M. sativa*, Frugier i wsp. [1998] uzyskali jeszcze większą ilość kandydatów (Tab. 19). Spośród 250 cDNA, zidentyfikowanych

Roślina	Porównywane stadia	Ilość wyjściowa*	Etap	Wydajność etapu	Wydajność całkowita	Literatura
hybrydyzacja subtrakcyjna						
<i>Gm</i>	N- / 21 dpi	150 000	x	x	0,8 %	Kouchi i Hata 1993
	N- / 8 dpi	100 000	x	x	0,25 %	
<i>Vf</i>	N- / 30 dpi	55 000	x	x	1,27 %	Perlick i Puhler 1993
<i>Ps</i>	N- / 35 dpi	60 000	x	x	0,83 %	Suganuma i wsp. 1995
<i>Mt</i>	Nod- / 4 dpi	30 000	x	x	1,58 %	Gamas i wsp. 1996
amplifikacja różnicowa						
<i>Lj</i>	N- / 7-11-13-21 dpi	8 000	x	x	1,7 %	Szczygłowski i wsp. 1997
<i>Mt</i>	N- / cz. Nod 2 h	4 000	x	x	0 %	de Carvalho Niebel i wsp. 1998
	N- / cz. Nod 24 h	2 400	x	x	0 %	
	N- / cz. Nod 48 h	2 000	x	x	0,2 %	
<i>LI</i>	N- / 21 dpi	3 500	x	x	1,4 %	Świdorski i wsp. 2000
<i>Vs</i>	N- / cz. Nod 1-3 h	27 600	x	x	0,12 %	Heidstra i wsp. 1997b
selekcja zimnych łysinek / kolonii połączona z analizą różnicową						
<i>Ms</i>	N- / br. spontan.	500	selekcja zimnych łysinek	50 %	50%	Frugier i wsp. 1998
			analiza indywidualna	8,4 %	4,2 %	
	Nod- / 5 dpi	?	selekcja zimnych łysinek	50 %**	50 %**	Jimenez-Zurdo i wsp. 2000
			analiza czwórek sond	20 %	10 %**	
<i>La</i>	N- / 34 dpi	5 000	selekcja zimnych kolonii (etap I)	50 %	50 %	niniejsza praca
			analiza par sond (etap II)	14,7 %	7,36 %	
			analiza indywidualna (etap III)	45 %	3,3 % ***	

Tabela 19. Porównanie wydajności różnych metod analizy różnicowej stosowanych w badaniach nad symbiotycznym wiązaniem azotu. *Gm* – *Glycine max*; *Vf* – *Vicia faba*; *Ps* – *Pisum sativum*; *Mt* – *Medicago truncatula*; *Lj* – *Lotus japonicus*; *LI* – *Lupinus luteus*; *Vs* – *Vicia sativa*; *Ms* – *Medicago sativa*; *La* – *Lupinus angustifolius*; N- - rośliny nieinfekowane, Nod- - rośliny infekowane szczepem nie produkującym czynnika Nod; cz. Nod – czynnik Nod; br. spontan. – brodawki spontaniczne.

* liczba rekombinantów użytych w przeszukaniu różnicowym

** brak danych na temat pierwszego etapu analizy; dla potrzeb porównania wydajności kolejnych kroków przyjęto, że wydajność pierwszego etapu jest identyczna, jak w obu pozostałych eksperymentach (50 %).

*** przy obliczaniu wydajności całkowitej uwzględniono, że na III etapie analizy różnicowej wykorzystano tylko 54,6 % klonów.

pierwotnie jako „zimne” metodą wyszukiwania zimnych łysinek, Autorzy wybrali ostatecznie 21 klonów o różnicowej ekspresji w brodawkach spontanicznych i korzeniach lucerny. Stanowiły one 4,2 % wszystkich klonów, a zatem więcej niż w przypadku analizy genów łubinu. Wyższą wydajność zapewniło prawdopodobnie przeprowadzenie analizy różnicowej poszczególnych klonów bezpośrednio po etapie wyszukiwania zimnych łysinek. Tymczasem, z uwagi na dużą liczbę cDNA łubinowych wybranych na pierwszym etapie analizy zdecydowano się na wprowadzenie dodatkowego kroku ograniczającego liczbę sond przez połączenie ich w pary (etap II analizy różnicowej, por. punkt D.1.3). Wiązało się to jednak z możliwością utracenia niektórych cDNA w przypadku zamaskowania różnicowego sygnału przez drugą sondę

lub odwrotnie, zakwalifikowaniem pary cDNA, z których tylko jeden generował sygnał różnicowy. Analogicznie, połączenie wstępnie wyselekcjonowanych klonów w czwórki sond przed etapem indywidualnej analizy cDNA, zaowocowało jeszcze niższą wydajnością wieloetapowego przeszukania różnicowego cDNA z młodych brodawek lucerny, przeprowadzonego przez Jimenez-Zurdo i wsp. [2000]. Mimo to każda z tych trzech złożonych analiz okazała się dużo wydajniejsza niż inne techniki selekcji, takie jak hybrydyzacja subtrakcyjna czy amplifikacja różnicowa (Tab. 19).

Nieco trudniejsze jest porównanie rzeczywistej skuteczności każdej z metod w identyfikacji genów związanych z symbiozą. Uzyskane wyniki nie zawsze weryfikowano innymi sposobami, np. przez hybrydyzacje northern czy RT PCR, bądź przeprowadzano taką analizę, ale tylko dla niewielkiego ułamka wyselekcjonowanych cDNA. Porównując dostępne dane można jednak uznać, że również pod tym względem kombinacja selekcji zimnych łysinek / kolonii z analizą różnicową należy do najskuteczniejszych metod selekcji (Lievens i wsp. 2001; Literatura zawarta w Tab. 19). W przypadku analizy cDNA z młodych brodawek lucerny sprawdzono ekspresję około 1/3 wyselekcjonowanych kandydatów, potwierdzając indukcję w brodawkach [Jimenez-Zurdo i wsp. 2000]. Z kolei analiza northern genów zaangażowanych w tworzenie spontanicznych brodawek u *M. sativa* potwierdziła różnicową ekspresję 9 spośród 21 kandydatów, czyli 43 % [Frugier i wsp. 1998]. Podobny wynik uzyskano w przedstawionej tu analizie cDNA łubinowych. Zbadano zmiany ekspresji w odpowiedzi na obecność bakterii symbiotycznych 59 wyselekcjonowanych kandydatów, stosując hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości. Różnicową ekspresję wykazano dla 25 z nich, co stanowi ok. 42 % klonów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym. (Uwzględniając, że kilka profili ekspresji może okazać się niepoprawnymi, jak sugerują analizy northern, odsetek ten może być nieco niższy – por. punkt E.1.3).

Dla porównania, w przypadku zastosowania hybrydyzacji subtrakcyjnej do identyfikacji genów związanych z symbiozą u *M. truncatula* spośród 30 tysięcy klonów wyselekcjonowano 473, po czym przy pomocy serii hybrydyzacji krzyżowych wykazano, że reprezentują one zaledwie 30 różnych rodzin cDNA [Gamas i wsp. 1996]. Mimo, że potwierdzono różnicową ekspresję reprezentantów wszystkich rodzin, to z uwagi na wysoką powtarzalność sekwencji przeszukanie to należy uznać za mało

efektywne. Inne analizy oparte na hybrydyzacji subtrakcyjnej były o wiele mniej skuteczne: pozytywnie zweryfikowano różnicową ekspresję zaledwie dwudziestu siedmiu spośród siedmiuset wyselekcjonowanych cDNA bobu i dziewiętnastu z pięciuset klonów cDNA grochu [Perlick i Puhler 1993; Suganuma i wsp. 1995]. Analizy typu amplifikacji różnicowej okazały się jeszcze mniej efektywne; spośród kilku - kilkudziesięciu uzyskiwanych zazwyczaj prążków o różnicowym profilu wiele stanowiło wyniki fałszywie pozytywne. Ponadto poddanie ich dalszej analizie okazywało się technicznie bardzo trudne i dodatkowo obniżało skuteczność metody [Świdorski i wsp. 2000; Heidstra i wsp. 1997b; de Carvalho Niebel i wsp. 1998].

E.1.2. Biblioteka LA02

Przeprowadzono reakcje jednokrotnego sekwencjonowania końców 5' pięćdziesięciu dziewięciu wyselekcjonowanych klonów, otrzymując kolekcję sekwencji EST LA02. Większość sekwencji zakończona była ciągiem poli(A), co sugeruje, że w pojedynczej reakcji uzyskano pełne sekwencje tych insertów. Wiele z nich to krótkie DNA, co nie jest zaskakujące, jako że znormalizowana biblioteka 115/2, z której pochodziły, nie była frakcjonowana pod względem długości. Stanowiło to jednak poważne utrudnienie przy ustalaniu adnotacji funkcjonalnej. Takie krótkie cDNA, zakończone ciągiem poli(A) z dużym prawdopodobieństwem reprezentują wyłącznie niekodujące końce 3' transkryptów, a w takim wypadku nie są przydatne przy przeszukiwaniu białkowych baz danych. Rzeczywiście, dla dwudziestu ośmiu sekwencji EST zakończonych poli(A) nie znaleziono homologów wśród znanych białek. Aż trzy czwarte tych sekwencji było krótsze niż 300 nt. Dziesięciu z nich udało się następnie przypisać funkcję na podstawie podobieństwa do sekwencji DNA. Trzy sekwencje wykazały homologię do cDNA leghemoglobin z łubinu żółtego: leghemoglobiny typu I (LA02EST009 i LA02EST054) oraz leghemoglobiny typu II (LA02EST048). We wszystkich trzech przypadkach wykazane podobieństwo dotyczyło wyłącznie niekodujących regionów 3' cDNA leghemoglobin. Adnotacja tych sekwencji EST była zatem możliwa wyłącznie na podstawie podobieństwa do zdeponowanych sekwencji DNA.

Niekodujące regiony 3' transkryptów stanowią zazwyczaj najbardziej unikalne fragmenty sekwencji, a w bazach DNA zdeponowano dotąd zaledwie kilkaset sekwencji roślin z rodzaju *Lupinus*. Tym można tłumaczyć niemożność adnotacji innych

sekwencji EST. Aby to rozstrzygnąć, niezbędne jest jednak poznanie dłuższych fragmentów cDNA i ponowne przeszukanie baz danych. Nie jest również wykluczone, że przynajmniej niektóre z wyselekcjonowanych klonów reprezentują nowe, niezidentyfikowane do tej pory geny, być może specyficzne dla roślin motylkowatych, a nawet dla łąbinu. Przykładem takiego genu łąbinowego, który jak się obecnie wydaje, wstępuje wyłącznie u przedstawicieli rodzaju *Lupinus*, jest *nodulina-45*, wykorzystana tu jako marker późnych stadiów brodawkowania (por. punkt E.2.2). Nie wykazuje on podobieństwa do żadnej ze zdeponowanych w bazach sekwencji, w tym do znanych genomowych sekwencji roślinnych. Gen *noduliny-45* ulega specyficznej ekspresji na wysokim poziomie w dojrzałych brodawkach łąbinu [Rice i wsp.1993]. Koduje on hydrofilowe białko zawierające N-terminalny peptyd sygnałny, dwa powtórzenia bogate w glicynę oraz liczne miejsca fosforylacji i mirystylacji. Analiza promotora *noduliny-45* z łąbinu wąskolistnego pozwoliła zidentyfikować region niezbędny do wywołania wysokiej ekspresji genu w dojrzałych brodawkach [Macknight i wsp. 1995]. Zawiera on motywy AAAGAT oraz CTCTT, obecne także w innych genach kodujących późne noduliny, między innymi leghemoglobiny czy białko N23 obecne w błonie peribakteroidalnej symbiosomów u soi. Mutacja pierwszego z motywów powodowała znaczący spadek ekspresji genu *noduliny-45* w brodawkach łąbinu [Macknight i wsp. 1995]. Testy retardacji w żelu wykazały także, że do zidentyfikowanego regionu (ale nie do elementów AAAGAT oraz CTCTT) wiąże się czynnik, będący prawdopodobnie homologiem NAT2 - białka wiążącego DNA, znalezione u soi, fasoli i *Sesbania*. Rola noduliny-45 nie została jednak dotąd określona.

Wydaje się, że w kolekcji LA02 znalazł się inny gen specyficzny dla rodzaju *Lupinus* i zaangażowany w późne stadia brodawkowania. Jest on reprezentowany przez trzy sekwencje tworzące kontig 3: LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043 (por. także punkt E.1.3). W bibliotece LA02 jest także co najmniej pięć innych sekwencji o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej, które wydają się dobrymi kandydatami na geny o podobnie wysokiej specyficzności gatunkowej, choć niekoniecznie są związane z symbiotycznym wiązaniem azotu. Na podstawie ich długości (446 – 783 nt) można sądzić, że nawet jeśli odczytane sekwencje w większości reprezentują regiony 3' UTR, to być może obejmują także fragmenty kodujące białka, co zwiększa prawdopodobieństwo adnotacji. Mimo to dla trzech z nich (LA02EST003, LA02EST049 i LA02EST059) nie znaleziono żadnych homologów w bazach. Dwa

pozostałe (LA02EST018 i LA02EST029) wykazały podobieństwo jedynie do niezidentyfikowanych sekwencji cDNA z roślin motylkowatych.

Jak wskazują wyniki poszukiwania sekwencji homologicznych, dwa spośród wyselekcjonowanych klonów prawdopodobnie reprezentują geny mikrosymbionta (LA02EST015 i LA02EST056). Ich obecność w znormalizowanej bibliotece cDNA można wyjaśnić występowaniem w sekwencji fragmentów bogatych w adeniny, dzięki którym zostały wychwycone w procesie izolacji mRNA. Podobnie można tłumaczyć obecność pięciu klonów wykazujących podobieństwo do niekodujących RNA (LA02EST001, LA02EST002, LA02EST033, LA02EST037 i LA02EST052). Dla czterech z nich znaleziono w bazach TGI sekwencje homologiczne, o podobnej adnotacji funkcjonalnej, więc obecność w znormalizowanej bibliotece cDNA sekwencji nie kodujących białek nie jest zjawiskiem odosobnionym.

E.1.3. Geny indukowane w trakcie brodawkowania

Analiza ekspresji przeprowadzona z wykorzystaniem makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości wykazała istotne zmiany w ekspresji 25 spośród 59 genów wybranych w analizie różnicowej, przynajmniej w jednym z analizowanych stadiów rozwoju. Większość zaobserwowanych zmian dotyczy dojrzałych, funkcjonalnych brodawek (15- i 34 dni po inokulacji bakteryjnej). Jest to wynik zrozumiały, zważywszy na fakt, że do selekcji genów zastosowano próby cDNA przygotowane z dojrzałych brodawek. Jednocześnie jest możliwe, że brak znaczących różnic w ekspresji genów na wcześniejszych etapach brodawkowania wynikał z dużego udziału tkanek niesymbiotycznych w próbie z infekowanych korzeni (por. wyniki analiz ekspresji markerowego genu ENOD40, punkt E.2.2).

Dla siedmiu genów wykonano także hybrydyzacje northern, w celu dodatkowej weryfikacji wyników uzyskanych dzięki makromacierzom DNA, wskazujących na ich różnicową ekspresję w brodawkach. Potwierdziła ona uzyskane profile ekspresji tych genów, dla których wcześniej obserwowano zbieżne wyniki w obu seriach hybrydyzacji do makromacierzy cDNA (LA02EST004, LA02EST028, LA02EST050, LA02EST051). Dla dwóch pozostałych genów makromacierze DNA wykazały wcześniej niejednoznaczne profile ekspresji, a analiza northern potwierdziła indukcję

tylko jednego z nich (LA02EST010). Nie wykazała natomiast zmian w ekspresji genu LA02EST040. Zatem dla innych genów, dla których obserwowano rozbieżności w wynikach obu serii hybrydyzacji do makromacierzy DNA, bądź różniły się one od tych przewidywanych na podstawie etapu III analizy różnicowej (jest ich siedem), profile ekspresji również wymagają dalszej weryfikacji.

Dla LA02EST042 - kolejnego analizowanego genu - nie uzyskano sygnału po hybrydyzacji northern. Oznacza to, że we wszystkich analizowanych stadiach rozwojowych ekspresja tego genu, o ile w ogóle zachodzi, utrzymuje się na bardzo niskim poziomie. Wskazywały na to częściowo również analizy jakościowe wyników pochodzących z hybrydyzacji makromacierzy DNA (por. Rys. 28). Należy dopuścić możliwość, że podobnie niska ekspresja innych genów mogła być przyczyną błędów w pomiarach ilościowych, jeśli obserwowany sygnał tylko nieznacznie przekraczał intensywność tła. Mogło to zamaskować różnicową ekspresję niektórych genów. Dodatkowo spory odsetek genów wykluczono przy analizie niektórych lub wszystkich punktów czasowych z uwagi na podprogową wartość sygnału (por. Tab. 16). Wydaje się zatem, że analiza ekspresji genów selekcjonowanych wstępnie pod kątem niskiej ekspresji w korzeniu byłaby skuteczniejsza przy zastosowaniu czulszych metod detekcji (np. real time PCR).

Zgodnie z oczekiwaniem, indukcję ekspresji w dojrzałych brodawkach wykazano dla wszystkich genów, które zakwalifikowano jako późne noduliny już na podstawie porównawczych analiz sekwencji. Były to geny kodujące leghemoglobinę typu II (LA02EST048), leghemoglobinę typu I (sekwencje tworzące kontig 5) oraz nodulinę-26 (LA02EST050). Bogate dane literaturowe dotyczące ich funkcji oraz ekspresji tych genów w symbiozie potwierdzają poprawność uzyskanych profili. Ekspresja genów leghemoglobin, zaangażowanych w kontrolowanie stężenia wolnego azotu w brodawkach, wiąże się z początkiem okresu wiązania azotu w symbiosomach i rozpoczyna się kilka do kilkunastu dni od ustanowienia symbiozy. Przykładowo, w łubinie żółtym obserwowano specyficzną ekspresję genu leghemoglobiny II od 13 dnia po inokulacji bakteryjnej [Świdorski i wsp. 2000]. Ekspresję klonu LA02EST048 również wykryto wyłącznie w brodawkach łubinu, w 15 i 34 dniu od inokulacji. Podobnie, późną noduliną jest nodulina-26. Białko to, zidentyfikowane pierwotnie u soi, jest transporterem z rodziny akwaporyn i stanowi główny składnik błony

peribakteroidalnej [Weaver i wsp. 1994; Rivers i wsp. 1997]. Kodujący je gen *N-26* ulega specyficznej ekspresji wyłącznie w brodawkach, w komórkach zainfekowanych mikrosymbiontem [Miao i Verma 1993].

Podobny profil ekspresji uzyskano dla klonu LA02EST028, o niejednoznacznej adnotacji funkcjonalnej. Jak wykazała szczegółowa analiza sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej, gen LA02EST028 jest bliskim homologiem genu LIDD2A18 z łubinu żółtego. Mają one również zgodne profile ekspresji – produktu genu LIDD2A18 nie wykryto w korzeniach ani nadziemnych organach łubinu żółtego. Ulegał on natomiast specyficznej indukcji w 13 dniu po inokulacji bakteryjnej [Świdorski i wsp. 2000]. Wyniki przeszukania białkowych baz danych wskazują, że oba geny są homologami uniwersalnych białek stresu (USP). W uzyskanej przez translację sekwencji aminokwasowej LA02EST028 zidentyfikowano fragment charakterystycznej dla tych białek domeny typu USPA. USPA to rodzina małych cytoplazmatycznych białek bakteryjnych, których ekspresja rośnie w odpowiedzi na szereg różnych czynników stresowych (niedobór składników odżywczych, obecność związków toksycznych, stres osmotyczny, ekspozycja na światło ultrafioletowe) [Nystrom i Neidhardt 1992, 1993, 1994]. Ich dokładna funkcja nie jest jednak znana. Białka USP reprezentują prawdopodobnie dwie podrodziny, różniące się strukturą. Jedna podrodzina wykazuje podobieństwo do struktury 1MJH uzyskanej dla białka MJ0577 z *Methanococcus jannaschii*, zdolnego do wiązania cząsteczki ATP [Zarembinski i wsp. 1998]. Podrodzina druga wykazuje podobieństwo do rozwiązanej struktury 1MJV białka z *Haemophilus influenza*, niezdolnego do wiązania ATP [Sousa i McKay 2001].

Obecność białek typu USP wykryto również w szeregu roślin jedno- i dwuliściennych. W ryżu jest co najmniej 10 białek tego typu [Sauter i wsp. 2002]. Jedno z nich, OsUSP1 należy do podrodziny białek wiążących ATP. Gen OsUSP1 ulega indukcji w najmłodszych międzywęźlach ryżu w ciągu 1 – 2 godzin od zanurzenia w wodzie. Jego ekspresja jest regulowana przez etylen, który gromadzi się w tkankach rośliny w odpowiedzi na zanurzenie [Sauter i wsp. 2002]. Wrażliwy na etylen jest również gen ER6 wyizolowany z niedojrzałych owoców pomidora, kodujący białko typu USP [Zegzouti i wsp. 1999]. W genomie *A. thaliana* wykryto 44 białka zawierające domenę USPA. Są to zarówno małe białka cytoplazmatyczne, przypominające te znajdujące u bakterii, jak i większe białka zawierające również inne domeny, np. kinazowe [Kerk i

wsp. 2003]. Sekwencja aminokwasowa LA02EST028 wykazuje wysokie podobieństwo do trzynastu białek z *A. thaliana*, charakteryzujących się jednocześnie najwyższą zachowawczością sekwencji w porównaniu z białkami bakteryjnymi (At2g47710, At3g11930, At1g09740, At3g62550, At3g03270, At1g68300, At4g27320, At3g17020, At3g01520, At5g54430, At1g11360, At5g14680 oraz At3g53990) [Kerk i wsp. 2003]. W sekwencjach wymienionych białek, (oraz w sekwencji LA02EST048) zachowane są między innymi te pozycje, które w bakteryjnych białkach biorą udział w oddziaływaniach z cząsteczką ATP. Jest zatem prawdopodobne, że białko kodowane przez gen LA02EST028 również wiąże ATP.

Taką zdolność wykazuje także białko ENOD18 z bobu, o dużej homologii do sekwencji aminokwasowej klonu LA02EST028 [Becker i wsp. 2001]. Kodujący je gen *VfENOD18* wyizolowano z biblioteki cDNA z symbiotycznych brodawek [Hohnjec i wsp. 2000]. Najsilniejsza ekspresja genu *VfENOD18* ma miejsce w dojrzałych brodawkach, w strefach wiązania azotu oraz przejściowej. Uznaje się go jednak za wczesną nodulinę z uwagi na fakt, że początek jego ekspresji ma miejsce w piątym dniu po inokulacji bakteryjnej i wyprzedza indukcję genu leghemoglobiny [Hohnjec i wsp. 2000]. Nie zgadza się to z profilem ekspresji uzyskanym dla klonu LA02EST028. Co więcej, w ekstraktach z łubinu wąskolistnego nie wykryto białka oddziałującego z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ENOD18, choć wykryto je u innych roślin o niezdeteminowanych brodawkach, a także u *A. thaliana* i *Z. mays* [Becker i wsp. 2001]. Jest zatem mało prawdopodobne, aby klon LA02EST028 reprezentował łubinowy odpowiednik genu *VfENOD18*.

Kolejny gen, dla którego analiza northern potwierdziła różnicową ekspresję w dojrzałych brodawkach, jest reprezentowany przez sekwencję LA02EST010. Pochodziła ona z dużo dłuższego insertu; dzięki jego zsekwencjonowaniu uzyskano ostatecznie sekwencję cDNA o długości 2200 nt. Prawdopodobnie zawiera ona błędy, nagromadzone w trakcie amplifikacji, ponieważ po odczytaniu zakodowanej w niej sekwencji aminokwasowej nie zidentyfikowano jednej dominującej ORF. Zidentyfikowano jednak trzy regiony wykazujące podobieństwo do szeregu białek roślinnych i zwierzęcych, zawierających domenę „RING finger”. Dzięki przeszukaniu bazy CDD w sekwencji LA02-010 także stwierdzono obecność tej domeny. Dodatkowo

wykazano obecność regionu bogatego w kwas glutaminowy w N-końcowej sekwencji prawdopodobnego produktu białkowego.

Domena „RING finger” to wyspecjalizowany rodzaj palca cynkowego o długości 40 do 60 aminokwasów, wiążący dwa atomy cynku, z charakterystycznym motywem C-X₂-C-X(9-39)-C-X(1-3)-H-X(2-3)-(N/C/H)-X₂-C-X(4-48)C-X₂-C. Istnieją jej dwa warianty, różniące się układem C/H w motywie - typ C₃H₂C₃ oraz typ C₃HC₄. Domena „RING finger” prawdopodobnie pośredniczy w oddziaływaniach białko – białko. Została zidentyfikowana w białkach pełniących różnorodne funkcje, takie jak replikacja wirusa, transdukcja sygnału, procesy rozwojowe, jest też obecna w ligazach ubikwitynowych E3 (np. c-CIb), dołączających ubikwitynę do białek przeznaczonych do degradacji w proteasomie [Nodzón i wsp. 2004; Kowalczyk i wsp. 2005; Kawasaki i wsp. 2005; Disch i wsp. 2006; Chen i Ni 2006].

W *L. japonicus* zidentyfikowano gen *LjBzf* kodujący białko zawierające motyw „RING finger” oraz region bogaty w kwas glutaminowy. Prawdopodobnie mutacja tego właśnie genu wpływa na fenotyp super-brodawkujących mutantów *astray* [Nishimura i wsp. 2002b]. Białko *LjBzf* nie wykazuje podobieństwa do regionów I-III aminokwasowej sekwencji LA02-010, a w C-końcowej części zawiera motyw suwaka leucynowego, którego obecności nie wykazano w sekwencji LA02-010. Stanowi ono jednak przykład negatywnego regulatora brodawkowania. Być może zidentyfikowany gen łubinowy zawierający podobne funkcjonalne motywy w sekwencji również pełni rolę ważnego regulatora procesów symbiotycznych.

Szczególnie interesujący wydaje się gen reprezentowany przez klony LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043, tworzące kontig 3. Wyniki przeszukania baz sekwencji sugerują, że nie występuje on poza roślinami z rodzaju *Lupinus*. Homologi sekwencji LA02-043 znaleziono tylko w łubinach, żółtym oraz białym. Być może stanowi on przykład genu specyficznego dla rodzaju *Lupinus*. Poznanie w przyszłości kompletnej sekwencji genomowej rośliny motylkowatej z pewnością okaże się pomocne w zweryfikowaniu tej hipotezy. Obecnie trwają prace nad poznaniem genomów dwóch roślin modelowych: *M. truncatula* (<http://www.medicago.org/genome>) oraz *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>).

Geny LIDD4A9 i LIDD2T15 z *L. luteus*, podobnie jak klony z biblioteki LA02 kodują późne noduliny, ulegające ekspresji w brodawkach od ok. 13 dpi, a nieobecne w korzeniach, łodygach, liściach i kwiatach [Świdorski i wsp. 2000]. Hybrydyzacja Southern pokazuje, że w łubinie żółtym mogą one reprezentować liczącą kilka białek małą rodzinę wielogenową [Świdorski 1997]. Z kolei EST E789_F został zidentyfikowany w bibliotece z korzeni proteoidalnych z *L. albus*. Hybrydyzacja różnicowa z użyciem filtrów nylonowych wykazała brak zmian w ekspresji genu w odpowiedzi na niedobór fosforu i rozwój korzeni proteoidalnych [Uhde-Stone i wsp. 2003]. W dedukowanej sekwencji aminokwasowej LA02-043 uzyskanej techniką 5' RACE nie wykryto żadnych konserwatywnych domen ani motywów, poza dwoma miejscami fosforylacji dla kinazy białkowej C. Podobnie, wyłącznie trzy miejsca fosforylacji znaleziono w sekwencji LIDD4A9, wykazującej 52 % identyczności z sekwencją z łubinu wąskolistnego. Fosforylacja przez kinazy białkowe należy do najpowszechniejszych i najistotniejszych mechanizmów regulacji transmisji sygnału. Ustalenie w jakie procesy konkretnie może być zaangażowany omawiany gen wymaga jednak dalszych analiz funkcjonalnych.

E.2. Geny markerowe

Celem tej części pracy było przygotowanie takiego zestawu markerów, które byłyby pomocne w ustaleniu funkcji nieznanymi genów, zgodnie z zasadą, że geny o podobnych profilach ekspresji mogą być powiązane funkcjonalnie i podlegać tym samym mechanizmom regulacyjnym. Podejście takie jest szeroko wykorzystywane w pracach z zakresu genomiki funkcjonalnej, w badaniach z zastosowaniem mikromacierzy DNA [Roth i wsp. 1998; Harrington i wsp. 2000; Aharoni i Vorst 2001]. Znanych jest szereg algorytmów pozwalających na grupowanie genów o podobnych profilach ekspresji [Eisen i wsp. 1998, Quackenbush 2001]. Dzięki takiemu podejściu odkryto na przykład, że nie scharakteryzowany wcześniej drożdżowy gen *YER044c* ulega takiej samej regulacji jak geny metabolizmu steroli. Zasugerowało to jego funkcję, a późniejsze badania wykazały, że rzeczywiście jest on zaangażowany w biosyntezę steroli [Hughes i wsp. 2000]. Podobne postępowanie stosuje się także na przykład do wstępnej selekcji genów - kandydatów zaangażowanych w rozwój procesów chorobowych [Alon i wsp. 1999; Kannan i wsp. 2001].

Ponieważ nadrzędnym celem pracy jest charakterystyka genów zaangażowanych w symbiotyczne wiązanie azotu w łubinie wąskolistnym, skupiono się na otrzymaniu markerów szlaków metabolicznych istotnych w symbiozie bądź takich, dla których wykazano pewne cechy wspólne z symbiozą (tworzenie brodawki korzeniowej, szlak transdukcji sygnału inicjowany przez czynnik Nod, sygnalizacja hormonalna, metabolizm węgla i azotu, reakcje obronne). Dodatkowo zaplanowano otrzymanie markerów pomocnych w interpretowaniu wyników hybrydyzacji (geny konstytutywne).

E.2.1. Kolekcja LA01

Do otrzymania cDNA genów markerowych zastosowano dwa odmienne podejścia. Pierwsze polegało na amplifikacji i sekwencjonowaniu kilkudziesięciu klonów wybranych losowo ze znormalizowanej biblioteki cDNA. Zakładano, że w otrzymanej puli znajdą się klony, reprezentujące różnorodne procesy metaboliczne, w tym te interesujące z punktu widzenia planowanych analiz. Oparto się przy tym na pracy Györgyey i wsp. dotyczącej *M. truncatula* [2000], gdzie sekwencjonowanie 389 losowo wybranych klonów z biblioteki cDNA z korzeni z młodymi brodawkami zaowocowało uzyskaniem kolekcji sekwencji EST. Reprezentowały one między innymi geny nodulin (40 klonów, 26 genów), geny metabolizmu podstawowego (54 klony, 51 genów), geny zaangażowane w biosyntezę białek (57 klonów, 45 genów) oraz geny związane z reakcjami obronnymi (16 klonów). Jednak uzyskany zbiór sześćdziesięciu siedmiu klonów LA01 z łubinu wąskolistnego zawiera stosunkowo niewielką liczbę sekwencji nadających się do bezpośredniego wykorzystania jako markery wyłącznie na podstawie adnotacji funkcjonalnej. Niektóre, np. cDNA białek rybosomalnych mogą posłużyć za kontrole o konstytutywnej ekspresji. Kilka sekwencji EST prawdopodobnie reprezentuje geny ulegające specyficznej indukcji pod wpływem wybranych czynników, np: LA01EST013 (białko nieznane / indukowane przez azotany), LA01EST031 (prawdopodobne białko membranowe / indukowane auksyną) czy LA01EST050 (białko phi1 indukowane przez fosforany). Jednak wyniki adnotacji tych klonów nie zawsze są jednoznaczne. Poza tym informacje na temat znalezionych w bazach homologów są zbyt skąpe, aby w móc choćby wstępnie wnioskować na tej podstawie o funkcji i spodziewanej ekspresji genów łubinowych. Inne sekwencje EST

LA01 w większości wykazywały podobieństwa do sekwencji o nieustalonej bądź tylko prawdopodobnej roli biologicznej.

Otrzymanie kolejnych klonów mogących mieć znaczenie jako markery wymagałoby dalszego próbkowania znormalizowanej biblioteki cDNA. Prowadziłyby to jednocześnie do zwiększenia ilości nieprzydatnych pod tym względem klonów, zwłaszcza że średnio około 30 - 34 procent uzyskanych w ten sposób sekwencji EST nie udaje się adnotować [Györgyey i wsp. 2000; Covitz i wsp. 1998; niniejsza praca]. Stąd źródłem prawie wszystkich markerów (nie licząc cDNA białek rybosomalnych, które wykorzystano podczas normalizacji danych uzyskanych przy pomocy makromacierzy cDNA) stało się klonowanie na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych, pierwotnie zaplanowane jako działanie uzupełniające.

Przeprowadzona analiza ekspresji genów LA01 w trakcie rozwoju brodawek przy pomocy makromacierzy cDNA wykazała istotne zmiany ekspresji jedynie dla pięciu z nich. Nie jest to wynik zaskakujący, ponieważ geny te w żaden sposób nie były selekcjonowane pod kątem różnicowej ekspresji. Uzyskany profil wydaje się jednak wiarygodny tylko w przypadku jednej sekwencji (LA01EST039, o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej), dla której indukcja ekspresji w dojrzałych brodawkach potwierdzona jest dodatkowo wynikami analizy jakościowej. Wyniki uzyskane dla dalszych czterech genów są niejednoznaczne. W przypadku genu LA01EST048 hybrydyzacja northern nie potwierdziła różnicowej ekspresji w brodawkach, co świadczy o tym, że profile ekspresji pozostałych sekwencji (LA01EST063 – brak adnotacji, LA01EST046 – brak adnotacji i LA01EST012 – kanał jonowy) również wymagają dalszej weryfikacji.

E.2.2. Kolekcja LA10

Opierając się o dostępne w literaturze informacje wybrano 23 geny i podjęto próbę ich amplifikacji. Z grupy genów metabolizmu węgla i azotu zaledwie dla dwóch dysponowano danymi na temat sekwencji cDNA z łubinu wąskolistnego. W przypadku aminotransferazy asparaginianu umożliwiło to zaprojektowanie specyficznego startera i amplifikację konkretnego, dobrze zidentyfikowanego produktu. Porównanie sekwencji otrzymanego klonu cDNA z sekwencjami konstytutywnej izoformy AAT-P1 oraz

indukowanej w brodawkach formy AAT-P2 potwierdziło uzyskanie właściwego markera. Hybrydyzacja do makromacierzy cDNA również wykazała, że marker LA10SEQ001 reprezentuje gen brodawkowo - specyficzny.

Nie udało się natomiast amplifikować w podobny sposób wybranego fragmentu cDNA syntetazy glutaminy. Otrzymany produkt LA10SEQ004 wykazuje wprawdzie wysoką zgodność sekwencji z roślinnymi syntetazami glutaminy, ale jego sekwencja nie jest zgodna z sekwencją brodawkowo - specyficznej formy GS z łubinu wąskolistnego, zdeponowanej w bazie NCBI po numerem X15578. W eksperymentach z użyciem makromacierzy cDNA również nie wykazano indukcji w brodawkach reprezentowanego przez marker genu. Uzyskanie brodawkowo – specyficznej formy GS prawdopodobnie okazało się problematyczne z uwagi na wysokie podobieństwo między różnymi formami GS, zarówno na poziomie nukleotydowym jak i aminokwasowym. Przykładowo, indukowana w brodawkach cytozolowa forma GS1 (AAB41554) i ulegająca konstytutywnej ekspresji także w innych organach chloroplastowa forma GS2 (Q9XQ94) z lucerny, wykazują 80 % podobieństwa na poziomie aminokwasowym. Również w łubinie wąskolistnym metodą hybrydyzacji Southern wykazano istnienie małej rodziny GS o profilach ekspresji zróżnicowanych czasowo i przestrzennie [Grant i wsp. 1989]. Zatem otrzymany klon prawdopodobnie reprezentuje konstytutywną odmianę łubinowej syntetazy glutaminy.

W pozostałych przypadkach oparto się na danych literaturowych i sekwencyjnych zgromadzonych dla innych roślin, głównie motylkowatych, projektując zdegenerowane startery komplementarne do zachowawczych regionów sekwencji. W ten sposób uzyskano pięć dodatkowych markerów szlaku metabolizmu węgla i azotu. Jednak oprócz karboksylazy fosfoenolopirogronianu (marker LA10SEQ021) nie udało się uzyskać brodawkowo –specyficznych lub indukowanych form tych genów. Podobnie jak w przypadku GS, przyczyną takiego wyniku było najprawdopodobniej zaprojektowanie mało specyficznych starterów, spowodowane wysokim podobieństwem sekwencji pomiędzy genami tworzącymi w roślinach rodziny wielogenowe [Miller i wsp. 1987, Farnham i wsp. 1989, Anderson i wsp. 1989, Silvente i wsp. 2003]. W przypadku urykazy (LA10SEQ003), zaliczanej do późnych nodulin, obserwowany po hybrydyzacji do makromacierzy cDNA brak indukcji w brodawkach prawdopodobnie wynika z bardzo niskiej intensywności sygnałów hybrydyzacji. W

pierwszej serii eksperymentów miała ona wartość podprogową na filtrach użytych do badania późnych stadiów brodawkowania. W drugiej serii wartość ta nieznacznie przekraczała progową.

Z powodzeniem amplifikowano fragmenty trzech spośród sześciu wybranych genów nodulin: *ENOD40* (LA10SEQ040), białka noduliny-45 (LA10SEQ041) i białka noduliny-26 (LA10SEQ042). Zgodnie z przewidywaniami, indukcję ekspresji genów obu późnych nodulin obserwowano w dojrzałych brodawkach łubinu. Z kolei specyficzna indukcja ekspresji genu *ENOD40* obserwowana była już w stadium 8 dni od inokulacji bakteryjnej. Jednak dane o ekspresji tego genu uzyskane dla innych roślin pokazują, że należy on do grupy bardzo wczesnych genów nodulinowych, indukowanych już w ciągu kilku godzin po inokulacji mikrosymbiontem. W przypadku brodawkowo – specyficznego genu *ENOD40B* z łubinu żółtego, do którego marker LA10SEQ040 wykazuje najwyższe podobieństwo, ekspresję obserwowano od 3 dnia po inokulacji bakteryjnej (najwcześniejsze testowane stadium symbiozy) [Podkowiński i wsp., w przygotowaniu]. Brak takiej indukcji w łubinie wąskolistnym w czwartym dniu po inokulacji może zatem wskazywać, że użyty w tym stadium materiał z infekowanych roślin zawierał nadmiar niesymbiotycznych tkanek korzeniowych w stosunku do rozwijających się w głębi zawiązków brodawek. Jest to jednocześnie wskazówką, że wyniki dotyczące tego punktu czasowego mogą nie być wiarygodne, zarówno w przypadku hybrydyzacji do makromacierzy DNA, jak i analizy northern. Uzyskanie dokładnych danych o ekspresji genów na tak wczesnych stadiach symbiozy wymagałoby prawdopodobnie zastosowania innej techniki zbierania materiału roślinnego, polegającej na przykład na oznaczeniu miejsca inokulacji i zbiorze precyzyjnie wyznaczonego fragmentu korzenia.

Innym podejściem, również bardzo pomocnym przy analizie tak wczesnych stadiów symbiozy jest zastosowanie subtrakcji. W Pracowni Biologii Molekularnej Roślin IChB PAN przygotowano subtrakcyjną bibliotekę cDNA z korzeniu łubinu wąskolistnego we wczesnych stadiach symbiozy (5 dpi), wzbogaconą o geny specyficzne dla tkanek symbiotycznych. Przeprowadzono różnicową hybrydyzację 384 klonów z tej biblioteki z próbami cDNA: wzbogaconą o cDNA specyficzne dla korzeni oraz wzbogaconą w cDNA specyficzne dla pięciodniowych brodawek. Pozwoliło to wstępnie

wyselekcjonować dwadzieścia cztery klony o podwyższonej ekspresji w tkankach symbiotycznych [Podkowiński i wsp., J. Fruit Ornam. Plant Res., w druku].

Pozostałe noduliny, dla których podjęto próby klonowania, reprezentują liczną rodzinę białek prolinobogatych o bardzo wysokiej homologii. Co więcej, sekwencje kodujące tych genów zawierają liczne powtórzenia, co bardzo utrudnia opracowanie specyficznych starterów. Prawdopodobnie z tego powodu dla żadnego z nich nie udało się uzyskać jednolitego produktu amplifikacji.

Uzyskano natomiast marker o konstytutywnej ekspresji (LA10SEQ064 – fragment genu aktyny) i wykorzystano go przy normalizacji danych uzyskanych dzięki makromacierzom cDNA. Amplifikowano również fragmenty cDNA genów związanych z sygnalizacją hormonalną i reakcjami obronnymi rośliny. Marker LA10SEQ080 reprezentuje gen wczesnej odpowiedzi na auksyny – AUX/IAA. Sekwencja LA10SEQ081 reprezentuje fragment genu syntazy chalkonowej, katalizującej reakcję kondensacji pierścieni arylowych chalkonów. Te zaś z kolei stanowią prekursorzy roślinnych flawonoidów – wtórnych metabolitów syntetyzowanych w odpowiedzi na różnorodne czynniki biotyczne i abiotyczne. Procesy, w których flawonoidy odgrywają istotną rolę, obejmują między innymi wzrost i rozwój rośliny, obronę przed patogenami, ochronę przed światłem UV. Są także zaangażowane w transdukcję sygnału w symbiozie z rizobiami i grzybami mikoryzowymi [Vogt i wsp. 1994; Harrison 1999; Perret i wsp. 2000; Mathesius 2001; Dixon 2001; Mo i wsp. 2005]. Geny CHS w większości roślin tworzą rodziny wielogenowe. W soi zidentyfikowano ich dziewięć [Matsumura i wsp. 2005]. W łubinie żółtym znaleziono dotąd dwa geny kodujące syntazę chalkonową: LLCHS2.1 i LLCHS4.1 – do którego marker LA10SEQ081 wykazuje najwyższe podobieństwo [Narożna i wsp. 2004].

Marker LA10SEQ082 jest homologiem genów kodujących alfa-dioksygenazy – enzymy katalizujące utlenianie kwasów tłuszczowych i produkcję lipidowych związków sygnalnych, zaangażowanych w reakcje na stres, zranienie i indukcję patogenami. U tytoniu na przykład, gen indukowanej patogenem alfa – dioksygenazy (PIOX) jest aktywowany w odpowiedzi na infekcję liści roślinożerną gąsienicą *Erwinia amylovora*, zranienie, światło ultrafioletowe, podanie kwasu jasmonowego, salicylowego oraz związków generujących powstawanie wolnych rodników (Sanz i wsp. 1998;

Hermsmeier i wsp. 2001; Izaguirre i wsp. 2003; Tirajoh i wsp. 2005). Białko PIOX wykazuje istotne podobieństwo do zwierzęcych cyklo-oksigenaz kierujących biosyntezą prostaglandyn, zaangażowanych w reakcje immunologiczne. Marker ten wybrano do amplifikacji z uwagi na wcześniejsze zidentyfikowanie sekwencji EST 366 LIN01 homologicznej do PIOX w bibliotece cDNA z infekowanych korzeni z łubinu żółtego (numer identyfikacyjny BG154076). W bazach EST występują licznie sekwencje EST z innych roślin motylkowatych o bardzo wysokim podobieństwie do markera LA10SEQ082 oraz sekwencji 366 LIN01. Pochodzą one z różnorodnych bibliotek cDNA – między innymi z korzeni infekowanych rizobiami, infekowanych grzybem *Fusarium solani*, bądź traktowanych elicitorem z *Phytophthora sojae*. Wskazuje to, że gen ten rzeczywiście jest zaangażowany w rozliczne oddziaływania rośliny z mikroorganizmami, zarówno symbiotycznymi jak i pasożytniczymi. Jakościowa analiza wyników ekspresji genu LA10SEQ082 uzyskanych dzięki makromacierzom cDNA, sugeruje jej obniżenie w symbiotycznych brodawkach. Wymaga to jednak sprawdzenia. Nie wykazano natomiast różnicowej ekspresji genów reprezentowanych przez markery LA10SEQ080 oraz LA10SEQ081.

Uzyskano także całkowite sekwencje cDNA dwóch genów zaangażowanych w szlak transdukcji sygnałów na wczesnych etapach symbiozy: *SYMRK* (LA10SEQ090) i *NFR5* (LA10SEQ091). Otrzymane sekwencje wykazują wysokie podobieństwo do homologicznych genów z innych roślin motylkowatych.

Jak pokazuje analiza northern, ekspresja łubinowego genu *LaSYMRK* utrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie w korzeniach i nie zmienia się w reakcji na niedobór przyswajalnych form azotu. Wykazała ona natomiast indukcję genu w trakcie rozwoju brodawek łubinowych – wzrost ekspresji *LaSYMRK* obserwowano od 8 dpi, a najwyższy poziom – w dojrzałych brodawkach (16- i 34 dpi). Wyniki te nie pokrywają się z profilem ekspresji ukazany przy pomocy makromacierzy DNA. Brak ekspresji w symbiozie obserwowano początkowo dla także dla homologicznego genu *DMI2* z *M. truncatula* [Bersoult i wsp. 2005]. Jednak użycie dużo czulszej techniki detekcji transkryptów w komórkach (analiza histochemiczna ekspresji beta glukuronidazy pod kontrolą promotora *DMI2*) pokazuje indukcję ekspresji genu *DMI2* w centralnej części zawiązków brodawek *Medicago*, w jeszcze nie zainfekowanych komórkach [Bersoult i wsp. 2005]. Potwierdzają to także wyniki uzyskane przy pomocy techniki real - time

PCR – silną indukcję ekspresji *DMI2* obserwowano w dziesiątym dniu po inokulacji. [Limpens i wsp. 2005]. Indukcję obserwowano jednak zaledwie w kilku warstwach komórek strefy infekcji [Bersoult i wsp. 2005]. Tłumaczy to wcześniejsze uzyskanie odwrotnych wyników dotyczących ekspresji tego genu; wyjaśnia również obserwowany brak wzrostu poziomu mRNA *LaSYMRK* obserwowany w mniej czułej niż hybrydyzacja northern analizie z użyciem makromacierzy DNA.

Najnowsze badania funkcjonalne genu pokazują, że kodowany przez niego receptor jest zlokalizowany w błonie komórkowej komórek strefy infekcji oraz w błonie tworzącej nici infekcyjne. Oprócz tego, że jest on zaangażowany w inicjację rozwoju brodawki, reguluje także prawidłowe tworzenie symbiosomów wpływając na zahamowanie wzrostu nici infekcyjnych i inicjację endocytozy bakterii [Limpens i wsp. 2005].

Ekspresja genu *NFR5* była poza możliwością detekcji przy użyciu zastosowanych technik hybrydyzacji. Jednak wydaje się, że warto podjąć kolejne próby analizy zmian ekspresji genu *NFR5* w korzeniach łubinu. Dotychczasowe badania wykazały różnice we wzorcach ekspresji genów w brodawkach zdeterminowanych i niezdeteminowanych [Madsen i wsp. 2003]. W *L. japonicus* gen ten ulega ekspresji jedynie na wczesnych etapach symbiozy, podczas gdy u *P. sativum* wykrywa się go także w dojrzałych brodawkach, gdzie następuje ciągłe uwalnianie bakterii z nici infekcyjnych i ciągła produkcja czynnika Nod. Biorąc pod uwagę przypisywaną genowi *NFR5* rolę receptora czynnika Nod oraz fakt, że brodawki łubinowe są zasadniczo typu niezdeteminowanego, należy przypuszczać, że czasowy wzorzec ekspresji *NFR5* w łubinie będzie typowy dla brodawek niezdeteminowanych. Ciekawie byłoby jednak ustalić, czy różnice w sposobie infekcji brodawek łubinowych znajdują odzwierciedlenie w lokalizacji produktów ekspresji genu *NFR5*.

Przedstawione tu wyniki dotyczące analizy zestawu markerowych cDNA z łubinu wąskolistnego mają charakter wstępny, rozpoznawczy. Ponieważ większość sklonowanych cDNA reprezentuje geny tworzące w roślinach rodziny wielogenowe, na podstawie sekwencji nie można jednoznacznie przewidzieć ich profilu ekspresji. Szczególnie widoczne to jest w przypadku markerów metabolizmu węgla i azotu – w większości przypadków nie udało się zidentyfikować poszukiwanych form genów o ekspresji wzmocnionej w brodawkach. Dlatego niezbędna jest dalsza charakterystyka

sekwencji i ekspresji tych genów. Wówczas otrzymana kolekcja markerowych cDNA może okazać się bardzo użyteczna w analizach ekspresji genów w łubinie, niekoniecznie dotyczących symbiotycznego wiązania azotu. Dodatkowo, określenie pełnych sekwencji cDNA receptorów *NFR5* oraz *SYMRK* otwiera nowe możliwości analizy najmniej poznanych, wczesnych etapów symbiozy w łubinie. Jest bardzo prawdopodobne, że badania szlaku transdukcji sygnału czynnika Nod ujawnią kolejne ciekawe aspekty tworzenia unikalnych pod wieloma względami brodawek łubinu.

E.3. *NFR5* jako marker w analizie filogenetycznej

Stosując receptorową domenę genu *NFR5* jako marker filogenetyczny uzyskano drzewo o topologii zgodnej z filogenezą ustaloną na podstawie połączonych sekwencji markerów niesymbiotycznych (ITS, LegCyc1A). Potwierdza ona siostrzaną pozycję łubinów i *Anarthrophyllum rigidum*, należących do tego samego plemienia Genistae, a także pokrewieństwo seradeli żółtej (*Ornithopus compressus*) i *Lotus japonicus*. Podobnie jak w przypadku filogenezy opartej o markery niesymbiotyczne, drzewo genu *NFR5* ujawnia podział rodzaju *Lupinus* na cztery główne grupy filogenetyczne. Pozwala przy tym na rozróżnienie dwóch niezależnych linii łubinów w obrębie Nowego Świata, co jest zgodne z danymi opartymi o analizę liczby chromosomów [Ainouche i wsp. 2004].

Prezentowane badania wskazują, że zmienność *NFR5* jest porównywalna lub nawet przewyższa zmienność sekwencji genów tradycyjnie wykorzystywanych w badaniach filogenetycznych roślin motylkowatych. Jak pokazuje analiza sekwencji, jest to gen szybko ewoluujący, co prowadzi do nagromadzenia stosunkowo dużej ilości mutacji. Pozwala to na uzyskanie drzewa o dobrej jakości i rozdzielczości, co ma duże znaczenie przy konstruowaniu drzew filogenetycznych. Cecha ta jest szczególnie istotna w badaniach filogenetycznych łubinów z tej racji, że pozwala na zróżnicowanie grupy łubinów andyjskich, których badanie natrafia na poważne trudności przy zastosowaniu markerów niesymbiotycznych [Ainouche i Bayer 1999; Fukuda i wsp. 2003]. Dodatkowo *NFR5* wykazuje bardzo niewielką zmienność długości sekwencji, co jest kolejną cenną cechą w badaniach filogenetycznych. W związku z tym wydaje się, że może on stanowić dogodny marker do badań filogenetycznych roślin motylkowatych w ogóle, nie tylko w obrębie plemienia Genistae.

Ciekawe wyniki przynoszą najnowsze prace łączące analizę filogenetyczną makro- i mikrosymbiontów z wynikami testów inokulacyjnych. Bena i wsp. [2005] porównali dane filogenetyczne dla roślin z rodzaju *Medicago* i bakterii *Sinorhizobium* oraz zbadali specyficzność ich oddziaływań symbiotycznych i dystrybucję geograficzną. Wykazują oni, że proces nabywania przez rośliny zdolności do interakcji symbiotycznych z nowymi szczepami bakteryjnymi miał istotny wpływ na możliwość ekspansji przez nowe gatunki *Medicago* w kierunku obszarów zasiedlanych przez niekompatybilne wcześniej szczepy (zachodnie obszary basenu Morza Śródziemnego). Oprócz rozszerzania specyficzności oddziaływań na nowe szczepy mikrosymbionta, zaobserwowano także specjalizację w kierunku jednorodnych populacji bakterii (co przypuszczalnie owocowało efektywniejszą symbiozą), a w przypadku niektórych gatunków *Medicago* - także rewersję w kierunku charakterystycznej dla przodków ograniczonej specyficzności. Z kolei analiza drzew filogenetycznych obu symbiontów ujawnia trzy węzły, gdzie rozgałęzienia linii filogenetycznych mogły zajść równoległe. Pokrywają się one ze zmianami w specyficzności oddziaływań symbiotycznych i sugerują możliwość występowania ko-specjacji w procesie ewolucji roślin motylkowatych i ich mikrosymbiontów. Datowanie tych wydarzeń ewolucyjnych nie wyklucza tej teorii, mimo że obecnie zgromadzone dane nie są wystarczające aby ją zdecydowanie potwierdzić [Bena i wsp. 2005].

Podobne spostrzeżenia, dotyczące prawdopodobnej ko-ewolucji wewnątrzgatunkowej izolowanych geograficznie amerykańskich populacji *Phaseolus vulgaris* i ich symbionta *Rhizobium etli* bv. phaseoli, opisano niedawno [Aguilar i wsp. 2004]. Analiza polimorfizmów w genie *NodC* bakterii ujawniła różnice genetyczne pomiędzy liniami *Rhizobium etli* bv. phaseoli pozyskanymi z różnych rejonów geograficznych. Ich dystrybucja pokrywała się z występowaniem tzw. centrów różnorodności populacji roślin (BD, ang. *bean diversity*), tzn. szczepy najliczniej występujące w danej glebie jednocześnie najskuteczniej wywoływały brodawkowanie u dzikich populacji fasoli z tego terenu.

Przeprowadzenie podobnych analiz w oparciu o sekwencje domeny receptorowej *NFR5* oraz sekwencje symbiotycznego genu bakteryjnego takiego jak *NodA*, związanego z syntezą czynnika Nod, który jest kluczowy dla specyficzności oddziaływań roślina –

bakteria, może być ciekawym rozwinięciem badań taksonomicznych wnikających w powiązania filogenetyczne analizowanych gatunków.

F. PODSUMOWANIE

Ustanowienie symbiozy pomiędzy roślinami motylkowatymi a rizobiami prowadzi do utworzenia brodawek korzeniowych, wewnątrz których zachodzi wiązanie i redukcja cząsteczkowego azotu przez mikrosymbionta. Utworzone związki azotowe (amidy lub ureidy) są pobierane przez roślinę, w zamian za związki węglowe. Symbiotyczne wiązanie azotu jest istotne nie tylko z ekologicznego i ekonomicznego punktu widzenia. Stanowi ono także piękny przykład naturalnego współdziałania dwóch organizmów, dostarczając atrakcyjnego modelu do badania procesów organogenezy oraz wymiany sygnałów w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami.

Celem rozprawy doktorskiej była selekcja i analiza ekspresji genów z łubinu wąskolistnego zaangażowanych w symbiotyczne wiązanie azotu. Stosując kilkietapową analizę różnicową około 5000 klonów ze znormalizowanej biblioteki cDNA z infekowanych korzeni dokonano wstępnej identyfikacji 90 klonów - kandydatów wykazujących zmiany ekspresji w odpowiedzi na infekcję mikrosymbiontem. Określono częściowo nukleotydowe sekwencje 59 z nich (kolekcja LA02) i porównano z dostępnymi w bazach sekwencjami. Na podstawie wykazanego podobieństwa dokonano adnotacji funkcjonalnej genów. Przygotowano także zestaw cDNA markerowych reprezentujących geny zaangażowane w znane szlaki metaboliczne, szlaki sygnalizacji i geny odpowiedzi obronnych rośliny. Zastosowano w tym celu dwa podejścia: sekwencjonowanie losowo wybranych klonów cDNA ze znormalizowanej biblioteki cDNA (kolekcja LA01) oraz – z dużo większą skutecznością – amplifikację fragmentów cDNA w oparciu o informacje o sekwencji genów homologicznych (kolekcja LA10). Następnie przeprowadzono analizę czasowych zmian ekspresji wszystkich genów w symbiozie, używając makromacierzy cDNA. Różnicowe profile ekspresji, obserwowane głównie dla stadiów dojrzałych brodawek, uzyskano dla 5 genów z kolekcji LA01, 6 genów z kolekcji LA10 oraz 25 genów z zestawu LA02. Analiza northern siedmiu z nich potwierdziła poprawność tych profili, które były zbieżne w dwóch seriach hybrydyzacji do makromacierzy cDNA, wskazując jednocześnie na konieczność weryfikacji pozostałych wyników.

Wśród genów o ekspresji podwyższonej w dojrzałych brodawkach znalazły się zarówno późne noduliny o dobrze udokumentowanych profilach ekspresji w symbiozie (leghemoglobiny, nodulina 26) jak i geny, o których ewentualnej roli w symbiozie niewiele wiadomo, prawdopodobnie kodujące: białko odpowiedzi na stres USP, proteazy serynowe, białko z motywem „RING finger”, homolog białka ARG2, białko transferu lipidów oraz geny o nieustalonej adnotacji funkcjonalnej. Jednocześnie wyniki analizy bioinformatycznej pokazują, że przynajmniej jeden z uzyskanych genów, reprezentowany przez sekwencje LA02EST004, LA02EST005 i LA02EST043, może być specyficzny dla rodzaju *Lupinus*.

Dwa z otrzymanych markerowych cDNA reprezentują geny receptorowe zaangażowane w transdukcję sygnału generowanego przez bakteryjny czynnik Nod: *NFR5* (LA10SEQ090) i *SYMRK* (LA10SEQ091). Ustalono całkowite sekwencje cDNA tych genów. Amplifikowano także fragmenty cDNA genu *NFR5* z dwudziestu innych gatunków łubinów oraz pokrewnych roślin motylkowatych i wykorzystano je do przeprowadzenia analizy filogenetycznej. Uzyskane drzewo ma topologię zbliżoną do drzew opartych o markery niesymbiotyczne. Wydaje się, że *NFR5* stanowi doskonały marker filogenetyczny który mógłby być wykorzystany między innymi w badaniach nad przypuszczalną ko-specjacją roślin motylkowatych i ich mikrosymbiontów.

LITERATURA

- Aguilar O.M., Riva O., Peltzer E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13548-13553
- Aharoni A., Vorst O. (2001) DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol Biol.* 48: 99-118
- Ainouche A.K., Bayer R.J., Misset M.T. (2004) Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines. *Plant Systematics and Evolution* 246: 211-222
- Ainouche A.K., Bayer R.J. (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: Papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 86: 590-607
- Albrecht C., Geurts R., Bisseling T. (1999) Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.* 18: 281-288
- Alon U., Barkai N., Notterman D.A., Gish K., Ybarra S., Mack D., Levine A.J. (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 6745-6750
- Amor B.B., Shaw S.L., Oldroyd G.E., Maillet F., Penmetsa R.V., Cook D., Long S.R., Denarie J., Gough C. (2003) The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* 34: 495-506
- Anderson M.P., Vance C.P., Heichel G.H., Miller S.S. (1989) Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiology* 90: 351-358
- Ane J.M., Kiss G.B., Riely B.K., Penmetsa R.V., Oldroyd G.E., Ayax C., Levy J., Debelle F., Baek J.M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B.A., Long S.R., Denarie J., Cook D.R. (2004) *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-1367
- Appels M.A., Haaker H. (1988) Identification of cytoplasmic nodule-associated forms of malate dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. *Eur J Biochem.* 171: 515-522

- Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillet F., de Billy F., Prome J.C., Denarie J., Truchet G. (1994) Rhizobium meliloti lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6: 1357-1374
- Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Moran J.F., Sarath G., Klucas R.V. (1998) Plant hemoglobins. *Plant Physiol.* 118: 1121-1125
- Barnett M.J., Toman C.J., Fisher R.F., Long S.R. (2004) A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 16636-16641
- Bauer P., Poirier S., Ratet P., Kondorosi A. (1997) MsEnod12A expression is linked to meristematic activity during development of indeterminate and determinate nodules and roots. *Mol Plant Microbe Interact.* 10: 39-49
- Bauer P., Ratet P., Crespi M.D., Schultze M., Kondorosi A. (1996) Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnod12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* 10: 91-105
- Becker J.D., Moreira L.M., Kapp D., Frosch S.C., Puhler A., Perlic A.M. (2001) The nodulin vENOD18 is an ATP-binding protein in infected cells of *Vicia faba* L. nodules. *Plant Mol Biol.* 47: 749-759
- Bena G., Lyet A., Huguet T., Olivieri I. (2005) Medicago-Sinorhizobium symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of Medicago. *J Evol Biol.* 18: 1547-1558
- Bernhard W.R., Matile P. (1994) Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant Sci.* 98: 7-14
- Bersoult A., Camut S., Perhald A., Kereszt A., Kiss G.B., Cullimore J.V. (2005) Expression of the *Medicago truncatula* DM12 gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* 18: 869-876
- Bibikova T.N., Blancaflor E.B., Gilroy S. (1999) Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 17:657-665
- Bibikova T.N., Zhigilei A., Gilroy S. (1997) Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* 203:495-505
- de Billy F., Grosjean C., May S., Bennett M., Cullimore J.V. (2001) Expression Studies on AUX1-like Genes in *Medicago truncatula* Suggest That Auxin Is Required at

- Two Steps in Early Nodule Development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 267-277
- de Blank C., Mylona P., Yang W.C., Katinakis P., Bisseling T., Franssen H. (1993) Characterization of the soybean early nodulin cDNA clone GmENOD55. *Plant Mol Biol.* 22: 1167-1171
- Bladergroen M.R., Spaink H.R. (1998) Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 353-359
- Boot K.J.M., van Brussel A.A.N., Tak T., Spaink H.P., Kijne J.W. (1999) Lipochitin Oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Reduce Auxin Transport Capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra* Roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 839-844
- Borisov A.Y., Madsen L.H., Tsyganov V.E., Umehara Y., Voroshilova V.A., Batagov A.O., Sandal N., Mortensen A., Schauser L., Ellis N., Tikhonovich I.A., Stougaard J. (2003) The Sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of Nin from *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131: 1009-1017
- Boroń L, Szczyglowski K, Konieczny A, Legocki AB (1989) Glutamine synthetase in *Lupinus luteus*. Identification and preliminary characterisation of nodule-specific cDNA clones. *Acta Biochimica Polonica* 36: 295-301
- Bothwell J.H., Ng C.K. (2005) The evolution of Ca²⁺ signalling in photosynthetic eukaryotes. *New Phytol.* 166: 21-38
- Brazma A., Robinson A., Vilo J. (2001) *Gene Expression Data Mining and Analysis*. W: B. Jordan (Ed.) *DNA Microarrays: Gene Expression Applications*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Brewin N.J. (2002) Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. *Biologist* 49: 1-5
- Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol.* 45: 345-382
- Campalans A., Kondorosi A., Crespi M. Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 16: 1047-1059
- Cardenas L, Holdaway-Clarke T.L, Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K. (2000) Ion Changes in Legume Root Hairs Responding to Nod Factors. *Plant Physiol* 123: 443-451

- Cardenas L., Vidali L., Dominguez J., Perez H., Sanchez F., Hepler P.K., Quinto C. (1998) Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals. *Plant Physiol.* 116: 871-877
- de Carvalho Niebel F., Lescure N., Cullimore J.V., Gamas P. (1998) The *Medicago truncatula* MtAnn1 Gene Encoding an Annexin Is Induced by Nod Factors and During the Symbiotic Interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 504-513
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R.V., Journet E.P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C., Denarie J. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1666
- Charon C., Sousa C., Crespi M., Kondorosi A. (1999) Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 11: 1953-1966
- Chen M., Ni M. (2006) RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2, a RING-Domain Zinc Finger Protein, Mediates Phytochrome-Controlled Seedling Deetiolation Responses. *Plant Physiol.* 140: 457-465
- Cheng X.G., Nomura M., Takane K., Kouchi H., Tajima S. (2000) Expression of two uricase (*Nodulin-35* genes in a non-ureide type legume, *Medicago sativa*. *Plant Cell Physiol.* 41: 104-109
- Cohn J.R., Uhm T., Ramu S., Nam Y.W., Kim D.J., Penmetsa R.V., Wood T.C., Denny R.L., Young N.D., Cook D.R., Stacey G. (2001) Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 125: 2104-2119
- Coba de la Pena T., Frugier F., McKhann H.I., Bauer P., Brown S., Kondorosi A., Crespi M. (1997) A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J.* 11: 407-420
- Colebatch G., Desbrosses G., Ott T., Krusell L., Montanari O., Kloska S., Kopka J., Udvardi M.K. (2004) Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 39: 487-512
- Compaan B., Yang W-C., Bisseling T., Franssen H. (2001) ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the

- highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil* 230: 1–8
- Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., VandenBosch K. (1995) Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7: 43-55
- Covitz P.A., Smith L.S., Long S.R. (1998) Expressed sequence tags from a root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiol.* 117: 1325-1332
- Csanadi G., Szecsi J., Kalo P., Kiss P., Endre G., Kondorosi A., Kondorosi E., Kiss G.B. (1994) ENOD12, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell* 6: 201-213
- Davies K.M., King G.A. (1993) Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.* 102: 1337-1340
- Day R.B., McAlvin C.B., Loh J.T., Denny R.L., Wood T.C., Young N.D., Stacey G. (2000) Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 1053-1070
- Debelle F., Plazanet C., Roche P., Pujol C., Savagnac A., Rosenberg C., Prome J.C., Denarie J. (1996) The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol Microbiol.* 22:303-314
- Dehio C., de Bruijn F.J. (1992) The early nodulin gene SrEnod2 from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant J.* 2:117-128
- Denarie J., Debelle F., Prome J.C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. (1996) *Annu Rev Biochem.* 65:503-535
- Disch S., Anastasiou E., Sharma V.K., Laux T., Fletcher J.C., Lenhard M. (2006) The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. *Curr Biol.* 16: 272-279
- Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847
- Dominguez D.C. (2004) Calcium signalling in bacteria. *Mol Microbiol.* 54: 291-297
- Dordas C., Hasinoff B.B., Rivoal J., Hill R.D. (2004) Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* 219: 66-72

- Dordas C., Hasinoff B.B., Igamberdiev A.U., Manac'h N., Rivoal J., Hill R.D. (2003a) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J.* 35: 763-770
- Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. (2003b) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot (Lond)*. 91 Spec No: 173-178
- Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S (1989) First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci.* 60: 215-222
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R. (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673-681
- Ehrhardt D.W., Atkinson E.M., Long S.R. (1992) Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256: 998-1000
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868
- El Yahyaoui F., Kuster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Puhler A., Becker A., Gouzy J., Vernie T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P. (2004) Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol.* 136: 3159-3176
- 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
- Esseling J.J., Lhuissier F.G., Emons A.M. (2003) Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol.* 132: 1982-1988
- Etzler M.E., Kalsi G., Ewing N.N., Roberts N.J., Day R.B., Murphy J.B. (1999) A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5856-5861
- Fang Y., and Hirsch A.M. (1998). Studying Early Nodulin Gene ENOD40 Expression and Induction by Nodulation Factor and Cytokinin in Transgenic Alfalfa. *Plant Physiol.* 116: 53-68
- Farnham M.W., Miller S.S., Griffith S.M., Vance C.P. (1989) Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules. II. Immunological distinction between two forms of the enzyme. *Plant Physiology* 93: 603-610

- Favery B., Complainville A., Vinardell J.M., Lecomte P., Vaubert D., Mergaert P., Kondorosi A., Kondorosi E., Crespi M., Abad P. (2002) The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 1008-1013
- Fedorova M., van de Mortel J., Matsumoto P.A., Cho J., Town C.D., VandenBosch K.A., Gantt J.S., Vance C.P. (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 130: 519-537
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1999) Elevation of the Cytosolic Free [Ca²⁺] Is Indispensable for the Transduction of the Nod Factor Signal in Alfalfa. *Plant Physiol.* 121: 273-279
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1998) The role of ion fluxes in Nod Factor signaling in *Medicago sativa*. *Plant J* 13: 455-463
- Felle H.H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1996) Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant J* 10: 295-301
- Fernandez-Lopez M., Goormachtig S., Gao M., D'Haese W., Van Montagu M., Holsters M. (1998) Ethylene-mediated phenotypic plasticity in root nodule development on *Sesbania rostrata*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 12724-12728
- Foucher F., Kondorosi E. (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol.* 43:773-786
- Fruhling M., Hohnjec N., Schroder G., Kuster H., Puhler A., Perlick A.M. (2000) Genomic organization and expression properties of the VfENOD5 gene from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci.* 155: 169-178
- Frugier F., Poirier S., Satiat-Jeunemaitre B., Kondorosi A., Crespi M. (2000) A Kruppel-like zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. *Genes Dev.* 14: 475-482
- Frugier F., Kondorosi A., Crespi M. (1998) Identification of novel putative regulatory genes induced during alfalfa nodule development with a cold-plaque screening procedure. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 358-366
- Fukuda T., Yokoyama J. Maki M. (2003) Molecular Evolution of cycloidea-Like Genes in Fabaceae. *J. Mol. Evol* 57: 588-597
- Gage D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:280-300

- Galvez S., Hirsch A.M., Wycoff K.L., Hunt S., Layzell D.B., Kondorosi A., Crespi M. (2000) Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiol.* 124: 1059-1068
- Gamas P., de Billy F., Truchet G. (1998) Symbiosis-specific expression of two *Medicago truncatula* nodulin genes, MtN1 and MtN13, encoding products homologous to plant defense proteins. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 393-403
- Gamas P., Niebel Fde C., Lescure N., Cullimore J. (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* 9: 233-242
- Goedhart J., Hink M.A., Visser A.J., Bisseling T., Gadella T.W. Jr. (2000) In vivo fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of Nod factors in root hair cell walls. *Plant J.* 21: 109-119
- Girard G., Roussis A., Gulyaev A.P., Pleij C.W., Spaink H.P. (2003) Structural motifs in the RNA encoded by the early nodulation gene *enod40* of soybean. *Nucleic Acids Res.* 31: 5003-5015
- Golinowski W., Łotocka B. (1991) Charakterystyka układu symbiotycznego rośliny motylkowate – rizobia. *Kosmos* 40: 331-346
- Golińska B., Sikorski M.M., Legocki A.B. (1989) Multiple forms of aspartate aminotransferase in lupin nodules. *Acta Physiologiae plantarum* 11: 173-179
- Goormachtig S., Valerio-Lepiniec M., Szczyglowski K., Van Montagu M., Holsters M., de Bruijn F.J. (1995) Use of differential display to identify novel *Sesbania rostrata* genes enhanced by *Azorhizobium caulinodans* infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 8: 816-824
- Grant M.R., Carne A., Hill D.F., Farnden K.J. (1989) The isolation and characterization of a cDNA clone encoding *Lupinus angustifolius* root nodule glutamine synthetase. *Plant Mol Biol.* 13: 481-490
- Greene E.A., Erard M., Dedieu A., Barker D.G. (1998) MtENOD16 and 20 are members of a family of phycocyanin-related early nodulins. *Plant Mol Biol.* 36: 775-783
- Gregerson R.G., Miller S.S., Twary S.N., Gantt J.S., Vance C.P. (1993) Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell* 5: 215-226
- Guerts R., Franssen H. (1996) Signal Transduction in *Rhizobium*-induced Nodule Formation. *Plant Physiol* 112:447-453

- Györgyey J., Vaubert D., Jimenez-Zurdo J.I., Charon C., Troussard L., Kondorosi A., Kondorosi E. (2000) Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 62-71
- D'Haese W., De Rycke R., Mathis R., Goormachtig S., Pagnotta S., Verplancke C., Capoen W., Holsters M. (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11789-11794
- Harrington C.A., Rosenow C., Retief J. (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol.* 3: 285-291
- Harrison M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 361- 389
- Heidstra R., Yang W.C., Yalcin Y., Peck S., Emons A.M., van Kammen A., Bisseling T. (1997a) Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* 124: 1781-1787
- Heidstra R., Nilsen G., Martinez-Abarca F., van Kammen A., Bisseling T. (1997b) Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. *Mol Plant Microbe Interact.* 10: 215-220
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spauk H., van Kammen A., Bisseling T. (1994) Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* 105:787-797
- Hermesmeier D., Schittko U., Baldwin I.T. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol.* 125: 683-700
- Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A. (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127: 1484-1492
- Hirsch A.M., Fang Y. (1994) Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Mol Biol.* 26: 5-9
- Hirsch A.M. (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237
- Hodge R., Paul W., Draper J., Scott R. (1992) Cold-plate screening: a simple technique for the isolation of low abundance, differentially expressed transcripts from conventional cDNA libraries *Plant J.* 2: 257-260

- Hohnjec N., Kuster H., Albus U., Frosch S.C., Becker J.D., Puhler A., Perlick A.M., Fruhling M. (2000) The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol Gen Genet.* 264: 241-250
- Hohnjec N., Becker J.D., Puhler A., Perlick A.M., Kuster H. (1999) Genomic organization and expression properties of the MtSucS1 gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 514-522
- Hughes T.R., Marton M.J., Jones A.R., Roberts C.J., Stoughton R., Armour C.D., Bennett H.A., Coffey E., Dai H., He Y.D., Kidd M.J., King A.M., Meyer M.R., Slade D., Lum P.Y., Stepaniants S.B., Shoemaker D.D., Gachotte D., Chakraburttu K., Simon J., Bard M., Friend S.H. (2000) Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102: 109-126
- Hunter W.J. (1993) Ethylene production by root nodules and effect of ethylene on nodulation in *Glycine max*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1947–1950
- Izaguirre M.M., Scopel A.L., Baldwin I.T., Ballare C.L. (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* 132: 1755–1767
- Jakubowska A. Kowalczyk S. (1998) Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. *Postępy Biochemii* 44: 72-81
- Jimenez-Zurdo J.I., Frugier F., Crespi M.D., Kondorosi A. (2000) Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenetic pathways acting in alfalfa nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 96-106
- Jones W.T., Jones S.D., Harvey D., Rodber K.R., Ryan G.B., Reynolds P. (1994) Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Aspartate Aminotransferase-P1 from Lupin Root Nodules. *Plant Physiol.* 104: 91-97
- Journet E.P., van Tuinen D., Gouzy J., Crespeau H., Carreau V., Farmer M.J., Niebel A., Schiex T., Jaillon O., Chatagnier O., Godiard L., Micheli F., Kahn D., Gianinazzi-Pearson V., Gamas P. (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res.* 30: 5579-5592
- Journet E.P., El-Gachtouli N., Vernoud V., de Billy F., Pichon M., Dedieu A., Arnould C., Morandi D., Barker D.G., Gianinazzi-Pearson V. (2001) *Medicago truncatula*

- ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:737-748
- Kalsi G., Etzler M.E. (2000) Localization of a Nod Factor-Binding Protein in Legume Roots and Factors Influencing Its Distribution and Expression. *Plant Physiol.* 124: 1039-1048
- Kannan K., Kaminski N., Rechavi G., Jakob-Hirsch J., Amariglio N., Givol D. (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 20: 3449-3455
- Kawasaki T., Nam J., Boyes D.C., Holt B.F. 3rd, Hubert D.A., Wiig A., Dangl J.L. (2005) A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response. *Plant J.* 44: 258-270
- Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W., Gribskov M. (2003) Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. *Plant Physiol.* 131: 1209-1219
- Kisiel A., Podkowiński j., Legocki A.B. (2004) Normalized cDNA library from narrow-leaved lupin roots as a source of genes involved in symbiotic interactions with *Bradyrhizobium* sp. W: Sadowski J. (Ed.) *Understanding the Plant Genome, PAGEN*, Poznań
- Kistner C., Parniske M. (2002) Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci.* 7: 511-518
- Ko, M.F. (1990) An "equalized cDNA library" by the reassociation of short double-stranded cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 18: 5705-5711
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Denarie J., Barker D.G., Becard G. (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131: 952-962
- Kouchi H., Shimomura K., Hata S., Hirota A., Wu G.J., Kumagai H., Tajima S., Suganuma N., Suzuki A., Aoki T., Hayashi M., Yokoyama T., Ohya T., Asamizu E., Kuwata C., Shibata D., Tabata S. (2004) Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 11: 263-274

- Kouchi H., Hata S. (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet.* 238: 106-119
- Kowalczyk S., Hadowska E., Piekarska A. (2005) Roślinne układy ubikwitylacji i degradacji białek w proteasomach, kluczowymi elementami hormonalnych szlaków sygnałowych. *Postępy Biochem.* 51: 171-187
- Krusell L., Madsen L.H., Sato S., Aubert G., Genua A., Szczyglowski K., Duc G., Kaneko T., Tabata S., de Bruijn F., Pajuelo E., Sandal N., Stougaard J. (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420: 422-426
- Kouchi H., Hata S. (1993) Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet.* 238: 106-119
- Kurkdjian A.C. (1995) Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor from *Rhizobium meliloti* induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* 107: 783–790
- Kuster H., Hohnjec N., Krajinski F., El Y.F., Manthey K., Gouzy J., Dondrup M., Meyer F., Kalinowski J., Brechenmacher L., van Tuinen D., Gianinazzi-Pearson V., Puhler A., Gamas P., Becker A. (2004) Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *J Biotechnol.* 108: 95-113
- Lee H., Hur C.G., Oh C.J., Kim H.B., Pakr S.Y., An C.S. (2004) Analysis of the root nodule-enhanced transcriptome in soybean. *Mol Cells.* 18: 53-62
- Legocki R.P., Verma D.P. (1980) Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of rhizobium-legume symbiosis. *Cell* 20:153-163
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J. (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781-784
- Levy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.P., Ane J.M., Lauber E., Bisseling T., Denarie J., Rosenberg C., Debelle F. (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364

- Liang P., Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971
- Lievens S., Goormachtig S., Holsters M. (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Res.* 29: 3459-3468
- Limpens E., Mirabella R., Fedorova E., Franken C., Franssen H., Bisseling T., Geurts R. (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10375-10380
- Limpens E., Bisseling T. (2003) Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 6: 343-50
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemsse J., Bisseling T., Geurts R. (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-633
- Lohar D.P., VandenBosch K.A. (2005) Grafting between model legumes demonstrates roles for roots and shoots in determining nodule type and host/rhizobia specificity. *J Exp Bot.* 56: 1643-1650
- Lopez-Lara I.M., Blok-Tip L., Quinto C., Garcia M.L., Stacey G., Bloemberg G.V., Lamers G.E., Lugtenberg B.J., Thomas-Oates J.E., Spaink H.P. (1996) NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Mol Microbiol.* 21: 397-408
- Loriod B., Victorero G., Nguyen C. (2001) cDNA macroarrays and microarrays on nylon membranes with radioactive detection. W: Jordan B. (Ed.) *DNA microarrays: gene expression application*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (57-86)
- Łotocka B., Kopcińska J., Górecka M., Golinowski W. (2000) Formation and abortion of root nodule primordia in *Lupinus luteus* L. *Acta Biologica Cracoviensa* 42: 870102
- Łotocka B., Golinowski W. (1995) Powstawanie i rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowatych. *Kosmos* 44: 569-578
- Macknight R.C., Reynolds P.H., Farnden K.J. (1995) Analysis of the lupin Nodulin-45 promoter: conserved regulatory sequences are important for promoter activity. *Plant Mol Biol.* 27: 457-466
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczygłowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2003) A receptor kinase

- gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640
- Manthey K., Krajinski F., Hohnjec N., Firnhaber C., Puhler A., Perlick A.M., Kuster H. (2004) Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:1063-1077
- Mathesius U. (2001) Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot.* 52: 419-426
- Mathesius U., Charon C., Rolfe B.G., Kondorosi A., Crespi M. (2000a) Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 617-628
- Mathesius U., Weinman J.J., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (2000b) Rhizobia can induce nodules in white clover by "hijacking" mature cortical cells activated during lateral root development. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 170-182
- Mathesius U., Schlaman H.R., Spaink H.P., Of Sautter C., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14: 23-34
- Mathis R., Grosjean C., de Billy F., Huguet T., Gamas P. (1999) The early nodulin gene MtN6 is a novel marker for events preceding infection of *Medicago truncatula* roots by *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 12: 544-555
- Matsumura H., Watanabe S., Harada K., Senda M., Akada S., Kawasaki S., Dubouzet E.G., Minaka N., Takahashi R. (2005) Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean. *Theor Appl Genet.* 110: 1203-1209
- Matvienko M., Van de Sande K., Yang W.C., van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. (1994) Comparison of soybean and pea ENOD40 cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. *Plant Mol Biol.* 26: 487-493
- Meixner C., Ludwig-Muller J., Miersch O., Gresshoff P., Staehelin C., Vierheilig H. (2005) Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta* 15:1-7

- Mergaert P., Van Montagu M., Prome J.C., Holsters M. (1993) Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:1551-1555
- Miao G.H., Verma D.P. (1993) Soybean nodulin-26 gene encoding a channel protein is expressed only in the infected cells of nodules and is regulated differently in roots of homologous and heterologous plants. *Plant Cell* 5: 781-794
- Miller S.S., Driscoll B.T., Gregerson R.G., Gantt J.S., Vance C.P. (1998) Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J.* 15: 173-84
- Miller S.S., Boylan K.L.M., Vance C.P. (1987) Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology* 84: 501-508
- Mitra R.M., Gleason C.A., Edwards A., Hadfield J., Downie J.A., Oldroyd G.E., Long S.R. (2004) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4701-4705
- Mo Y., Nagel C. Taylor L.P. (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7213-7217
- Mulligan J.T., Long S.R. (1985) Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6609-6613
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 7: 869-885
- Nap J.P., Bisseling T. (1990) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis; the legume root nodule. *Science* 250: 948-954
- Narożna D., Paś J., Schneider J., Madrzak C.J. (2004) Two sequences encoding chalcone synthase in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) may have evolved by gene duplication. *Cell Mol Biol Lett.* 9: 95-105
- Navarro-Gochicoa M.T., Camut S., Niebel A., Cullimore J.V. (2003) Expression of the Apyrase-Like APY1 Genes in Roots of *Medicago truncatula* Is Induced Rapidly and Transiently by Stress and Not by *Sinorhizobium meliloti* or Nod Factors. *Plant Physiol.* 131: 1124-1136

- Niebel Fde C., Lescure N., Cullimore J.V., Gamas P. (1998) The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 504-513
- Nishimura R., Hayashi M., Wu G.J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M., Harada K., Kawaguchi M. (2002a) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429
- Nishimura R., Ohmori M., Fujita H., Kawaguchi M. (2002b) A Lotus basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 15206-15210
- Nodzon L.A., Xu W.H., Wang Y., Pi L.Y., Chakrabarty P.K., Song W.Y. (2004) The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 40: 996-1006
- Nystrom T., Neidhardt F.C. (1994) Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol Microbiol.* 11: 537-544
- Nystrom T., Neidhardt F.C. (1993) Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *J Bacteriol.* 175: 3949-3956
- Nystrom T., Neidhardt F.C. (1992) Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 6: 3187-3198
- Oba H., Tawarayama K., Wagatsuma T. (2001) Arbuscular mycorrhizal colonization in *Lupinus* and related genera. *Soil Science And Plant Nutrition.* 47: 685-694
- Oldroyd G.E., Engstrom E.M., Long S.R. (2001b) Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 13:1835-1849
- Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol.* 15: 531-535
- Pacios-Bras C., Schlaman H.R., Boot K., Admiraal P., Langerak J.M., Stougaard J., Spaink H.P. (2003) Auxin distribution in *Lotus japonicus* during root nodule development. *Plant Mol Biol.* 52: 1169-1180

- Pathirana M.S., Samac D.A., Roeven R., Yoshioka H., Vance C.P., Grantt J.S. (1997) Analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa nodules. *Plant J.* 12: 293-304
- Penmetsa R.V., Cook D.R. (1997) A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* 275: 527-530
- Perlick A.M., Puhler A. (1993) A survey of transcripts expressed specifically in root nodules of broadbean (*Vicia faba* L.). *Plant Mol Biol.* 22: 957-970
- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Micobiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201
- Pichon M., Journet E.P., De Billy F., Dedieu A., Huguet T., Truchet G., Barker D.G. (1994) ENOD12 gene expression as a molecular marker for comparing Rhizobium-dependent and -independent nodulation in alfalfa. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 740-747
- Pingret J.L., Journet E.P., Barker D.G. (1998) Rhizobium nod factor signaling: Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell* 10: 659-672
- Quackenbush J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet.* 2: 418-427
- Pueppke S.G., Broughton W.J. (1999) Rhizobium sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:293-318
- Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592
- Rafalski J.A., Hanafey M., Miao G.H., Ching A., Lee J.M., Dolan M., Tingey S. (1998) New experimental and computational approaches to the analysis of gene expression. *Acta Biochim Pol.* 45: 929-934
- Ramirez M., Graham M.A., Blanco-Lopez L., Silvente S., Medrano-Soto A., Blair M.W., Hernandez G., Vance C.P., Lara M. (2005) Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. *Plant Physiol.* 137: 1211-1227
- Ramu S.K., Peng H.M., Cook D.R. (2002) Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact.* 15: 522-528

- Relic B., Talmont F., Kopcinska J., Golinowski W., Prome J.C., Broughton W.J. (1993) Biological activity of Rhizobium sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 6: 764-774
- Reynolds P.H., Smith L.A., Dickson J.M., Jones W.T., Jones S.D., Rodber K.A., Carne A., Liddane C.P. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding aspartate aminotransferase-P2 from lupin root nodules. *Plant Mol Biol.* 19: 465-472
- Reynolds P.H.S., Farnden K.J.F. (1979) The involvement of aspartate aminotransferases in ammonium assimilation in lupin nodules. *Phytochemistry* 18: 1625-1630
- van Rhijn P., Fang Y., Galili S., Shaul O., Atzmon N., Wininger S., Eshed Y., Lum M., Li Y., To V.V., Fujishige N., Kapulnik Y., Hirsch A.M. (1997) Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and Rhizobium-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 5467-5472
- van Rhijn P., Vanderleyden J. (1995) The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev.* 59: 124-142
- Rice S.J., Grant M.R., Reynolds P.H.S., Farnden K.J.F. (1993) DNA sequence of Nodulin-45 from *Lupinus angustifolius*. *Plant Sci.* 90: 155-166
- Riely B.K., Ane J.M., Penmetsa R.V., Cook D.R. (2004) Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 408-413
- Rivers R.L., Dean R.M., Chandy G., Hall J.E., Roberts D.M., Zeidel M.L. (1997) Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem.* 272: 16256-16261
- Roberts N.J., Brigham J., Wu B., Murphy J.B., Volpin H., Phillips D.A., Etzler M.E. (1999) A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. *Mol Gen Genet.* 262: 261-267
- Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J., Prome J.C. (1991a) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67:1131-1143
- Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. (1991b) Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J Biol Chem.* 266:10933-10940

- Rodriguez-Llorente I.D., Perez-Hormaeche J., Mounadi K.E., Dary M., Caviedes M.A., Cosson V., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J. (2004) From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis. *Plant J.* 39: 587-598
- Rohrig H., John M., Schmidt J. (2004) Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A. *Biochem Biophys Res Commun.* 325: 864-870
- Rohrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. (2002) Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1915-1920
- Rolfe B.G. (1988) Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *BioFactors* 1:3-10
- Roth F.P., Hughes J.D., Estep P.W., Church G.M. (1998) Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat Biotechnol.* 16: 939-945
- de Ruijter N.C.A., Bisseling T., Emons A.M.C. (1999) Rhizobium Nod factors induce an increase in subapical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 829–832
- Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanders D., Brownlee C., Harper J.F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706
- Sanz A., Moreno J.I., Castresana C. (1998) PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *The Plant Cell* 10: 1523–1537
- Sargent T.D., Dawid I.B. (1983) Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* 222: 135-139
- Sauter M., Rzewuski G., Marwedel T., Lorbiecke R. (2002) The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J Exp Bot.* 53: 2325-2331
- Schauser L., Roussis A., Stiller J., Sotugaard J. (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402:191-195
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470

- Scheres B., Van De Wiel C., Zalensky A., Horvath B., Spaink H., Van Eck H., Zwartkruis F., Wolters A.M., Gloude-mans T., Van Kammen A., Bisseling T. (1990a) The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction. *Cell* 60: 281-294
- Scheres B., van Engelen F., van der Knaap E., van de Wiel C., van Kammen A., Bisseling T. (1990b) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* 2: 687-700
- Searle I.R., Men A.E., Laniya T.S., Buzas D.M., Iturbe-Ormaetxe I., Carroll B.J., Gresshoff P.M. (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299: 109-112
- Shaw S.L. and Long S.R. (2003) Nod Factor Elicits Two Separable Calcium Responses in *Medicago truncatula* Root Hair Cells. *Plant Physiol.* 131: 976-984
- Shi L., Twary S.N., Yoshioka H., Gregerson R.G., Miller S.S., Samac D.A., Grantt J.S., Unkefer P.J., Vance C.P. (1997) Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell* 9: 1339-1356
- Schmidt J.S., Harper J.E., Hoffman T.K., Bent A.F. (1999) Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. *Plant Physiol.* 119: 951-960
- Sieberer B., Emons A.M.C. (2000) Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* 214:118-127
- Silvente S., Camas A., Lara M. (2003) Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *J Exp Bot.* 54: 749-755
- Sousa M.C., McKay D.B. (2001) Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure* 9: 1135-1141
- Sousa C., Johansson C., Charon C., Manyani H., Sautter C., Kondorosi A., Crespi M. (2001). Translational and structural requirements of the early nodulin gene enod40, a short-open reading frame-containing RNA, for elicitation of a cell-specific growth response in the alfalfa root cortex. *Mol. Cell. Biol.* 21: 354-366
- Spaink H.P., Weinman J., Djordjevic M.A., Wijffelman C.A., Okker R.J., Lugtenberg B.J. (1989) Genetic analysis and cellular localization of the Rhizobium host specificity-determining Node protein. *EMBO J.* 8: 2811-2818

- Sprent, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin of some Leguminosae. *Plant, Cell Environ.* 3: 35-43
- Stahelin C., Charon C., Boller T., Crespi M., Kondorosi A. (2001) *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15366-15371
- Steen A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers O.P., Kok J. (2003) Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem* 278: 23874-23881
- Stougaard J. (2000) Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiol.* 124: 531-540
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczygłowski K., Parniske M. (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962
- Stróżycki PM, Skapska A, Szczesniak K, Sobieszczuk E, Briat J-F, Legocki AB (2003) Differential expression and evolutionary analysis of the three ferritin genes in the legume plant *Lupinus luteus* *Physiologia Plantarum* 118: 380–389
- Suganuma N., Yamamoto A., Itou A., Hakoyama T., Banba M., Hata S., Kawaguchi M., Kouchi H. (2004) cDNA macroarray analysis of gene expression in ineffective nodules induced on the *Lotus japonicus* *sen1* mutant. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 1223-1233
- Suganuma N., Tamaoki M., Kouchi H. (1995) Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. *Plant Mol Biol.* 28: 1027-1038
- Szczygłowski K., Amyot L. (2003) Symbiosis, Inventiveness by Recruitment? *Plant Physiol.* 131: 935-940
- Szczygłowski K., Hamburger D., Kapranov P., de Bruijn F.J. (1997) Construction of a *Lotus japonicus* Late Nodulin Expressed Sequence Tag Library and Identification of Novel Nodule-Specific Genes. *Plant Physiol.* 114: 1335-1346
- Szczygłowski K., Boroń L., Szybiak-Strozycka U., Legocki A.B. (1989) Characterization of cDNA clone coding for Nodulin-45 from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Science.* 65: 87-95

- Szybiak-Strozycka U, Strozycki P, Sikorski M, Golinska B, Madrzak C, Legocki AB. (1987) Lupin leghemoglobins during root nodule development. *Acta Biochim Pol.* 34(2):79-85
- Świdorski M.R., Zaborowska Ż., Legocki A.B. (2000) Identification of new nodulin cDNAs from yellow lupine by differential display. *Plant Sci.* 151: 75-83
- Świdorski M.R (1997) Praca doktorska. Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań
- Takeda N., Okamoto S., Hayashi M., Murooka Y. (2005) Expression of LjENOD40 Genes in Response to Symbiotic and Non-Symbiotic Signals: LjENOD40-1 and LjENOD40-2 Are Differentially Regulated in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1291-1298
- Tang C., Kuo J., Longnecker N.E., Thomson J.C., Robson A.D. (1993) High pH causes disintegration of the root surface in *Lupinus angustifolius* L. *Annals of Botany* 71: 201-207
- Tansengco M.L., Hayashi M., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Murooka Y. (2003) Crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131: 1054–1063
- Tansengco M.L., Imaizumi-Anraku H., Yoshikawa M., Takagi S., Kawaguchi M., Hayashi M., Murooka Y. (2004) Pollen development and tube growth are affected in the symbiotic mutant of *Lotus japonicus*, crinkle. *Plant Cell Physiol.* 45: 511-520
- Temple S.J., Heard J., Ganter G., Dunn K., Sengupta-Gopalan C. (1995) Characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide sequence, in situ localization, and transcript analysis. *Mol Plant Microbe Interact.* 8: 218-227
- Tirajoh A., Aung T.S., McKay A.B., Plant A.L. (2005) Stress-responsive alpha-dioxygenase expression in tomato roots. *J Exp Bot.* 56: 713-723
- Trepp G.B., Temple S.J., Bucciarelli B., Shi L.F., Vance C.P. (1999) Expression map for genes involved in nitrogen and carbon metabolism in alfalfa root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact.* 12: 526-535
- Truchet C., Barker D.G., Camut S., de Billy F., Vasse J., Huguet T. (1989) Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 65-68

- Uhde-Stone C., Zinn K.E., Ramirez-Yanez M., Li A., Vance C.P., Allan D.L. (2003) Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* 131: 1064-1079
- Vieweg M.F., Fruhling M., Quandt H.J., Heim U., Baumlein H., Puhler A., Kuster H., Andreas M.P. (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 62-69
- Vijn I., Yang W.C., Pallisgard N., Ostergaard Jensen E., van Kammen A., Bisseling T. *VsENOD5*, *VsENOD12* and *VsENOD40* expression during *Rhizobium*-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. *Plant Mol Biol.* 28: 1111-1119
- Vogt T., Pollak P., Tarlyn N., Taylor L.P. (1994) Pollination- or wound induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell* 6: 11-23
- Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Catoira R., Penmetsa R.V., Cook D., Gough C., Denarie J., Long S. (2000) Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13407–13412
- Wan J.S., Sharp S.J., Poirier G.M., Wagaman P.C., Chambers J., Pyati J., Hom Y.L., Galindo J.E., Huvar A., Peterson P.A., Jackson M.R., Erlander M.G. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol.* 14: 1685-1691
- Wang Z., Brown D.D. (1991) A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11505-11509
- Ward D.T. (2004) Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium.* 35: 217-228
- Weaver C.D., Shomer N.H., Louis C.F., Roberts D.M. (1994) Nodulin 26, a nodule-specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel. *J Biol Chem.* 269: 17858-17862
- Weerasinghe R.R., Collings D.A., Johannes E., Allen N.S. (2003) The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. *Planta* 218: 276-287
- Winefield C.S., Reddington B.D., Jones W.T., Reynolds P.H., Farnden K.J. (1994) Cloning and characterization of a cDNA encoding aspartate aminotransferase-P1 from *Lupinus angustifolius* root tips. *Plant Physiol.* 104: 417-423

- Yang W.C., Katinakis P., Hendriks P., Smolders A., de Vries F., Spee J., van Kammen A., Bisseling T., Franssen H. (1993) Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* 3: 573-585
- Yoshioka H., Gregerson R.G., Samac D.A., Hoevens K.C., Trepp G.B., Grantt J.S., Vance C.P. (1999) Aspartate aminotransferase in alfalfa nodules: localization of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. *Mol Plant-Microbe Interact.* 12: 263-274
- Zaborowska Z., Starzycki M., Femiak I., Swiderski M., Legocki A.B. (2002) Yellow lupine gene encoding stearyl-ACP desaturase--organization, expression and potential application. *Acta Biochim Pol.* 49: 29-42
- Zarembinski T.I., Hung L.W., Mueller-Dieckmann H.J., Kim K.K., Yokota H., Kim R., Kim S.H. (1998) Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 15189-15193
- Zegzouti H., Jones B., Frasse P., Marty C., Maitre B., Latch A., Pech J.C., Bouzayen M. (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.* 18: 589-600

WYKAZ TABEL I RYSUNKÓW

Tabela 1. Ekspresja niektórych genów nodulin w warunkach symbiotycznych i niesymbiotycznych.....	35
Tabela 2. Lista plazmidów z zestawu AFGC Microarray Control Set wykorzystanych jako kontrole	49
Tabela 3. Lista stosowanych enzymów	50
Tabela 4. Lista używanych zestawów do wykonywania reakcji.....	50
Tabela 5. Lista używanych markerów długości DNA	51
Tabela 6. Lista wykorzystanych starterów uniwersalnych	51
Tabela 7. Lista wykorzystanych starterów specyficznych do poszczególnych sekwencji.....	52
Tabela 8. Lista innych wykorzystanych materiałów i odczynników	54
Tabela 9. Roztwory używane do sporządzenia pożywki do hodowli roślin	56
Tabela 10. Porównanie wydajności izolacji całkowitego RNA i znakowania ss cDNA przy zastosowaniu różnych metod izolacji	82
Tabela 11. Biblioteka LA02 sekwencji EST uzyskanych przez częściowe sekwencjonowanie klonów wybranych w trzyletowym przeszukaniu znormalizowanej biblioteki cDNA.....	90
Tabela 12. Biblioteka LA01 sekwencji EST uzyskanych w wyniku jednokrotnego sekwencjonowania klonów losowo wybranych ze znormalizowanej biblioteki cDNA	97
Tabela 13. Lista sekwencji źródłowych użytych do zaprojektowania starterów do amplifikacji fragmentów cDNA genów markerowych z lubinu	102
Tabela 14. Biblioteka LA10 fragmentów cDNA genów markerowych, uzyskanych przez klonowanie na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych	105
Tabela 15. Analiza jakościowa sond reprezentujących kontrole negatywne	121
Tabela 16. Odsetek genów o sygnale przewyższającym progową wartość detekcji na poszczególnych filtrach	121
Tabela 17. Normalizacja sygnału dla odpowiadających sobie par filtrów A (kontrola) i B (eksperyment) w serii 1	122
Tabela 18. Normalizacja sygnału dla odpowiadających sobie par filtrów A (kontrola) i B (eksperyment) w serii 2	122
Tabela 19. Porównanie wydajności różnych metod analizy różnicowej stosowanych w badaniach nad symbiotycznym wiązaniem azotu	166
Rysunek 1. Schemat ogólny struktury czynników Nod.....	12
Rysunek 2. Wczesne etapy odpowiedzi rośliny na obecność mikrosymbionta bakteryjnego	19
Rysunek 3. Schemat struktury białek NFR5 (A), NFR1 i Lyk3 (B) oraz SYMRK (C)	20
Rysunek 4. Budowa anatomiczna brodawek (A) niezdeteminowanych; (B) zdeterminowanych (C) lupinoidalnych	24
Rysunek 5. Metabolizm węgla i azotu w symbiotycznej brodawce niezdeteminowanej	32
Rysunek 6. Schemat postępowania przy ustalaniu końców 5' transkryptów	75

Rysunek 7. Schemat trzyetapowego przeszukania znormalizowanej biblioteki cDNA, mającego na celu wyselekcjonowanie genów o podwyższonej lub obniżonej ekspresji w trakcie symbiozy z bradyrizobiami.....	80
Rysunek 8. Przykładowy obraz insertów uzyskanych przez amplifikację PCR klonów wybranych we wstępnym przeszukaniu znormalizowanej biblioteki cDNA	84
Rysunek 9. Rozkład par sond wyselekcjonowanych na drugim etapie analizy różnicowej na odpowiadających sobie filtrach z poddanych hybrydyzacji zestawów.....	85
Rysunek 10. Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych produktów amplifikacji insertów z klonów wyselekcjonowanych w trakcie analizy różnicowej.....	87
Rysunek 11. Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych produktów amplifikacji insertów z losowo wybranych klonów	95
Rysunek 12. Sekwencja markera LA10SEQ001	107
Rysunek 13. Wyniki przeszukania bazy CDD aminokwasowymi sekwencjami markerów.....	108
Rysunek 14. Porównanie sekwencji nukleotydowej LA10SEQ040 z cDNA ENOD40B i ENOD40C z łubinu żółtego	111
Rysunek 15. Kontig 1 – złożenie sekwencji LA02EST002 – LA02EST013 – LA01EST064.....	114
Rysunek 16. Kontig 2 – złożenie sekwencji LA02EST052 – LA02EST066	114
Rysunek 17. Kontig 3 – złożenie sekwencji LA02EST004 – LA02EST005 – LA02EST043.....	114
Rysunek 18. Kontig 4 – złożenie sekwencji LA02EST006 – LA02EST055	115
Rysunek 19. Kontig 5 – złożenie sekwencji LA02EST009 – LA02EST051 – LA02EST054.....	116
Rysunek 20. Kontig 6 – złożenie sekwencji LA01EST061 – LA02EST033	117
Rysunek 21. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 1	125
Rysunek 22. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 2	126
Rysunek 23. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów markerowych (LA10) – część 3	127
Rysunek 24. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 1	128
Rysunek 25. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 2	129
Rysunek 26. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 3	130
Rysunek 27. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 4	131
Rysunek 28. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla genów wyselekcjonowanych w przeszukaniu różnicowym (LA02) – część 5	132
Rysunek 29. Wyniki analiz ekspresji przez hybrydyzację do makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości dla losowo wybranych genów (LA01).....	133

Rysunek 30. Analiza ekspresji typu northern grupy genów wybranej na podstawie wyników profilowania ekspresji przy użyciu makromacierzy cDNA o wysokiej gęstości.....	139
Rysunek 31. Strategia sekwencjonowania insertu LA02-010	141
Rysunek 32. Tłumaczenie sekwencji cDNA LA02-010 na aminokwasową	142
Rysunek 33. Graficzne przedstawienie rozkładu podobieństwa klonu LA02-010 do białek znalezionych przy przeszukiwaniu baz danych, utworzone przez program Blast	145
Rysunek 34. Wynik przeszukania bazy CDD fragmentem sekwencji LA02-010 zawierającej region II	146
Rysunek 35. Schematyczne przedstawienie prawdopodobnej struktury chimerycznego insertu zawierającego EST LA02EST004 oraz fragment cDNA leghemoglobiny	147
Rysunek 36. Klonowanie końca 5' LA02-043	148
Rysunek 37. Złożenie sekwencji kontigu 3 i klonów utworzonych metodą 5' RACE oraz sekwencja aminokwasowa przewidywanego produktu białkowego	149
Rysunek 38. Wynik porównania sekwencji aminokwasowych zakodowanych w LA02-043, LIDD4A9, LIDD2T15 i E789-F	150
Rysunek 39. Porównanie nukleotydowych sekwencji LA02EST028 z łubinu wąskolistnego oraz LIDD2A18 z łubinu żółtego	152
Rysunek 40. Porównanie aminokwasowej sekwencji LA02EST028 ze zidentyfikowanymi w bazach danych sekwencjami białek homologicznych oraz sekwencjami EST z roślin motylkowatych ...	153
Rysunek 41. Ustalanie sekwencji cDNA <i>LaNFR5</i>	154
Rysunek 42. Porównanie sekwencji aminokwasowych <i>LaNFR5</i> , <i>NFR5</i> (<i>L. japonicus</i> , CAE02598) i <i>Sym10</i> (<i>P. sativum</i> , CAE02594)	155
Rysunek 43. Ustalanie sekwencji cDNA <i>LaSYMRK</i>	157
Rysunek 44. Porównanie sekwencji aminokwasowych <i>LaSYMRK</i> i innych roślin motylkowatych.....	158
Rysunek 45. Analiza northern ekspresji genu <i>LaSYMRK</i> w łubinie.....	160
Rysunek 46. Drzewo filogenetyczne rodzaju <i>Lupinus</i> utworzone w oparciu o symbiotyczny marker <i>NFR5</i>	162
Rysunek 47. Topologia drzewa filogenetycznego rodzaju <i>Lupinus</i> opartego o markery niesymbiotyczne	163