

JOANNA KOPCIŃSKA, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

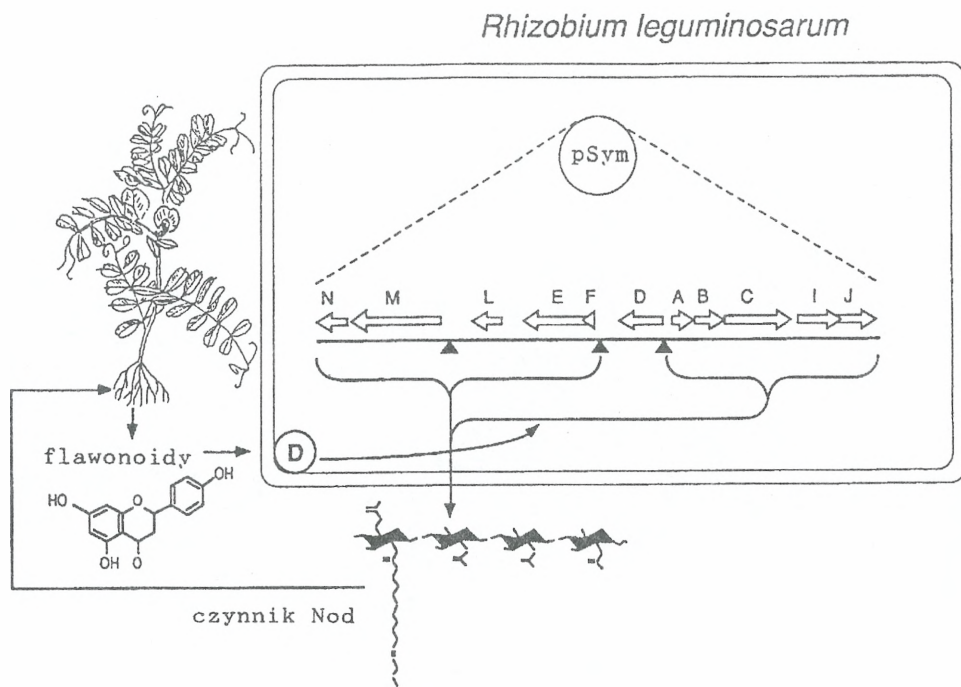
Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy, SGGW  
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

CZYNNIK Nod — CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA W INTERAKCJI ROŚLINY  
MOTYLKOWATE—RHIZOBIUM

Glebowe bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* są zdolne do indukcji brodawek na korzeniach, a niekiedy także na łodygach roślin motylkowatych — unikalnych organów, w których zachodzi proces wiązania i redukcji azotu atmosferycznego. Symbioza rizobiów z motylkowatymi jest procesem specyficznym — jeden gatunek bakterii zakaża tylko określone gatunki roślin, a rozwój brodawek jest kontrolowany zarówno przez geny bakteryjne, jak i roślinne. Wzajemne rozpoznanie symbiontów i precyzyjny mechanizm kontroli aktywacji i współdziałania bakteryjnych genów symbiotycznych i genów roślinnych to podstawowe warunki powstania funkcjonalnego układu symbiotycznego. Badania dotyczące molekularnych podstaw procesów infekcji i brodawkowania wykazały, że rośliny motylkowate i żyjące w ich ryzosferze rizobia wymieniają chemiczne sygnały, które mają istotne znaczenie w rozpoznaniu partnerów i inicjacji symbiozy (rys. 1).

BAKTERYJNE GENY SYMBIOTYCZNE

U bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* geny związane z symbiozą są położone na chromosomie, u *Rhizobium* znajdują się na pozachromosomalnej, kolistej cząsteczce DNA — plazmidzie symbiotycznym (pSym). Geny te dzieli się na dwie podstawowe grupy: geny *nod* i *nol* — geny brodawkowania (nodulation genes), indukujące inicjację i rozwój brodawki oraz geny *fix* i *nif* (fixation i nitrogen fixation genes) odpowiedzialne za wiązanie azotu atmosferycznego. W grupie genów brodawkowania wyróżnia się geny *com nod* (common nodulation genes), występujące u wszystkich zbadanych dotąd rizobiów i geny *hsn nod* (host-specific nodulation genes) różne dla gatunku lub szczepu bakterii. Geny brodawkowania są oznaczone kolejnymi literami alfabetu, i tak geny *com nod* to geny *ABC IJ*, geny *hsn nod* charakterystyczne na, przykład, dla *Rhizobium meliloti* to geny *G, P, Q, i H*. Indukcja transkrypcji genów brodawkowania zachodzi pod wpływem flawonoidów i przy udziale bakteryjnego białka NodD.



Rys. 1. Interakcja bakteryjnych i roślinnych cząstek sygnałowych (wg SPAINK i współaut. 1993, zmienione).

## FLAWONOIDY

Są wtórnymi metabolitami wydzielanymi do podłoża przez korzenie roślin motylkowatych. Ilość i rodzaj flawonoidów w wydzielinie korzeniowej zależy od gatunku rośliny i jej stadium rozwoju. Flawonoidy wykazują różnorodną aktywność biologiczną, między innymi związki z grupy flawonów, flawononów i izoflawonów są naturalnymi induktorami transkrypcji genów brodawkowania (ROLFE 1988). Różne gatunki motylkowatych wydzielają zwykle nie jeden, a mieszaninę flawonoidów zawierającą zarówno silne, jak i słabe aktywatory genów *nod*, inhibitory procesu a także flawonoidy obojętne dla brodawkowania. Wzajemny wpływ tych klas flawonoidów determinuje siłę i jakość ostatecznego efektu ich działania jako aktywatorów transkrypcji genów brodawkowania (HARTWIG i współaut. 1989, MAXWELL i współaut. 1989).

## BIAŁKO NodD

Jest bakteryjnym białkiem regulatorowym, produktem genu *nodD*. Gen ten, w przeciwieństwie do pozostałych genów *nod*, podlega ekspresji konstytutywnej,

regulowanej przez jego własny produkt (SPAINK i współaut. 1989). Białka NodD różnych gatunków i szczepów rizobiów, mimo dość dużego podobieństwa (75% homologii), różnią się między sobą „wrażliwością” na flawonoidy (SPAINK i współaut. 1987). Oznacza to, że każdy gatunek rizobium syntetyzuje właściwe sobie białko D, które współdziała w aktywacji transkrypcji genów brodawkowania tylko z określonymi flawonoidami. Interakcja między chemicznym sygnałem (flawonoidami) wysyłanym przez roślinę a bakteryjnym białkiem NodD jest więc pierwszym istotnym etapem determinującym swoistość symbiozy.

Mechanizm aktywacji genów brodawkowania jest podobny u wszystkich rizobiów. Interakcja flawonoid — białko NodD, zachodzi w wewnętrznej membranie komórki bakteryjnej. Cytoplazmatyczna część białka NodD wiąże się z krótkimi (47 par zasad), konserwatywnymi sekwencjami (nod box) w regionach promotorowych operonów genów *nod*, natomiast część wbudowana w membranę współdziała z flawonoidem, który prawdopodobnie powoduje zmianę konformacji cząsteczki białka NodD, a to z kolei indukuje transkrypcję genów brodawkowania (HIRSCH 1992).

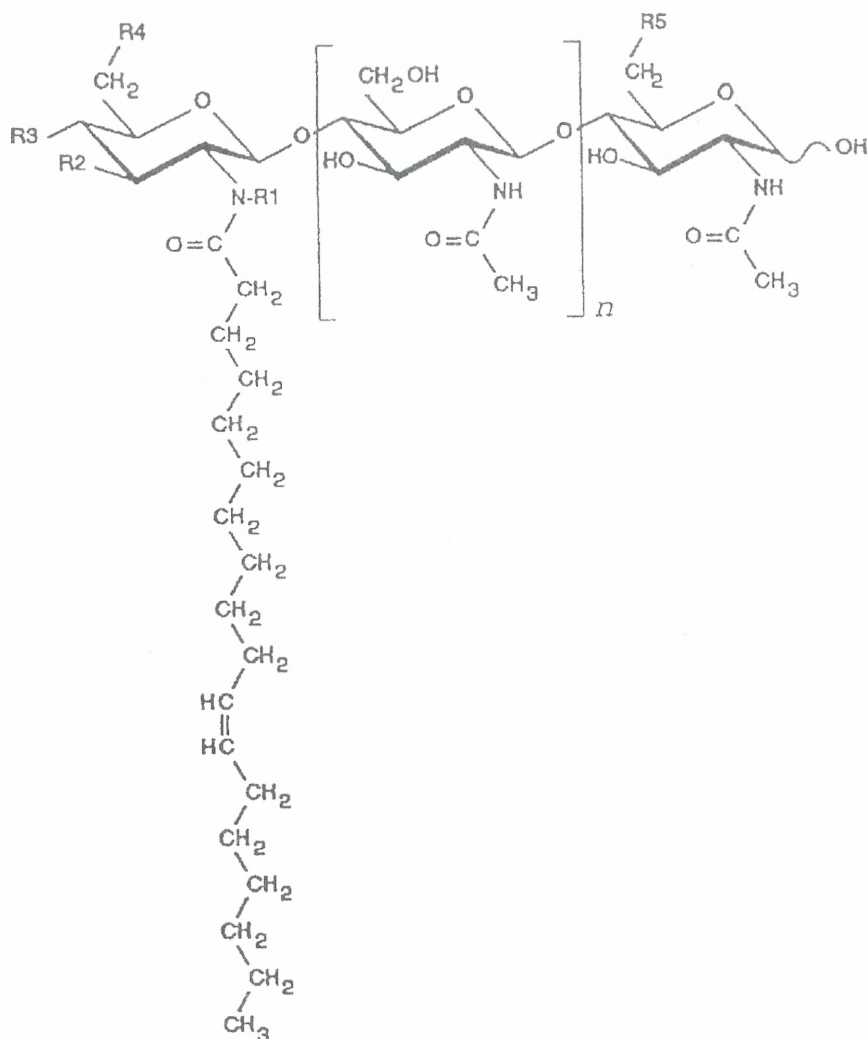
U gatunków rizobiów, które mają więcej niż jedną kopię genu *nodD* (np. *Bradyrhizobium japonicum* 2 kopie, *Rhizobium meliloti* 3 kopie), a co za tym idzie syntetyzują kilka rodzajów białka NodD, proces aktywacji transkrypcji genów brodawkowania jest bardziej złożony. Wynika to z odmiennego mechanizmu regulacji ekspresji każdej z kopii genu *nodD*, a także różnic w biologicznych własnościach rodzajów białek NodD kodowanych przez te kopie (SCHULTZE i współaut. 1994). I tak na przykład, u *Rhizobium meliloti luteolina* w kombinacji z białkiem NodD1 jest aktywatorem genów *nod*, ale w połączeniu z białkiem NodD2 działa jako inhibitor transkrypcji (HARTWIG i współaut. 1990, HONMA i współaut. 1990). U niektórych bakterii stwierdzono istnienie dodatkowych mechanizmów związanych z regulacją transkrypcji genów *nod*. U *Rhizobium meliloti* jest to represor *NolR*, u *Bradyrhizobium japonicum* — produkt genów *nodWV* (SCHULTZE i współaut. 1994).

#### CZYNNIK Nod

Wynikiem aktywacji genów brodawkowania jest synteza przez bakteryjnego symbionta cząsteczki sygnałowej, tak zwanego czynnika Nod (nod factor). Po raz pierwszy czynnik Nod został oczyszczony i scharakteryzowany dla *Rhizobium meliloti* (LEROUGE i współaut. 1990). Obecnie jest znana już struktura i aktywność biologiczna czynników Nod kilku innych gatunków bakterii (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*).

Czynnik Nod jest lipo-oligosacharydem o szkielecie cząsteczki wspólnym dla wszystkich przebadanych dotąd rizobiów (rys. 2). Szkielet ten jest zbudowany z podjednostek *N*-acetyl-glukozaminowych, których liczba waha się od 3 do 5 w zależności od gatunku bakterii. Do nieredukcyjnego końca cząsteczki jest przyłączony łańcuch szesnasto- lub osiemnastowęglowego kwasu tłuszczowego ze zmienną liczbą podwójnych wiązań (2, 3, 4). W pozycjach R<sub>1</sub>–R<sub>5</sub> występują

różne podstawniki charakterystyczne dla gatunku i szczepu bakterii (PRICE i współaut. 1992, SPAINK 1992, SPAINK i współaut. 1993).



Rys. 2. Podstawowa struktura bakteryjnej cząsteczki sygnałowej.

Czynnik Nod jest syntetyzowany przy udziale białek kodowanych zarówno przez geny *com nod*, jak i *hsn nod*. Geny *com nodABC* są związane z syntezą podstawowego szkieletu cząsteczki czynnika Nod; mutanty *nodABC<sup>-</sup>* nie syntetyzują cząsteczki sygnałowej i tracą zdolność do zakażenia gospodarza roślinnego. Białka kodowane przez geny *hsn nod* odpowiadają za przyłączenie do podstawowego szkieletu cząsteczki sygnałowej podstawników typowych dla określonego gatunku bakterii (HIRSCH 1992, SCHULTZE i współaut. 1994).

Mutacje w genach gatunkowo specyficznych (*hsn nod*) powodują zmianę struktury i aktywności biologicznej czynnika Nod, a to prowadzi do obniżenia

zdolności bakterii do infekcji lub zmiany gospodarza roślinnego, na przykład mutacje w genie *nodH* *Rhizobium meliloti* powodują, że nie infekuje on lucerny — rośliny gospodarza, natomiast indukuje powstawanie brodawek na wyce — roślinie spoza grupy infekcyjnej (FAUCHER i współaut. 1988).

Tak więc bakteryjne molekuly sygnałowe są kolejnym czynnikiem (obok interakcji flawonoid—białko NodD) decydującym o gatunkowej specyficzności układu symbiotycznego motylkowate—*Rhizobium*.

#### BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ CZYNNIKA Nod

Pierwszą reakcją rośliny na inokulację homologicznym szczepem *Rhizobium* jest skręcanie włośników, a lokalne zmiany struktury ściany włośnika umożliwiają infekcję bakteryjną. We włośnikach inokulowanych roślin wspanię i grochu stwierdzono ekspresję roślinnych genów kodujących specyficzne symbiotyczne białka włośnikowe, tak zwane haduliny (GLOUDEMANS i współaut. 1989, KRAUSE i BROUGHTON 1992).

Równocześnie z infekcją włośników, komórki kory pierwotnej korzenia dzielą się tworząc primordium brodawki. W większości przypadków (85%) powstaje ono naprzeciwko bieguna ksylemowego. W rozwijającej się brodawce podlegają aktywacji geny kodujące specyficzne dla stanu symbiozy białka, tak zwane noduliny (LEGOCKI i VERMA 1980). Ze względu na czas ekspresji wyróżnia się dwa typy genów nodulinowych: wczesne i późne. Noduliny wczesne (*Enod*) pojawiają się przed rozpoczęciem wiązania azotu atmosferycznego i biorą udział w najwcześniejszych etapach interakcji roślina — bakteria (skręcanie włośników, tworzenie nici infekcyjnych) a także są zaangażowane w procesy morfogenetyczne (podział komórek kory korzenia, tworzenie primordium brodawki). Geny nodulin późnych podlegają ekspresji tuż przed lub jednocześnie z procesem wiązania N<sub>2</sub>.

Zastosowanie metod immunocytochemicznych daje możliwość dość precyzyjnego określenia czasowej i tkankowej lokalizacji ekspresji genów nodulinowych i pozwala wnioskować o roli nodulin w morfogenezie brodawki, na przykład nodulina *Enod2* występuje w wewnętrznej warstwie komórek kory brodawki soi, grochu, łubinu, lucerny, a przypisywana jej rola polega na tworzeniu bariery tlenowej, zapewniającej odpowiednie warunki dla funkcjonowania wrażliwej na tlen nitrogenazy (DICKSTEIN i współaut. 1988, van de WIEL i współaut. 1990). Zlokalizowana w strefie infekcji w brodawkach grochu i lucerny *Enod12* bierze udział w „przygotowaniu” komórek do infekcji (HIRSCH i współaut. 1993, SCHERES i współaut. 1990). Z procesem wzrostu nici infekcyjnych i proliferacją bakterii wiąże się działanie noduliny *Enod5*, wykrywane tylko w komórkach zainfekowanych *Enod3* i *Enod14* są odpowiedzialne prawdopodobnie za transport jonów metali przez błonę bakteroidalną (SCHERES i współaut. 1990).

Podany egzogennie czynnik Nod powoduje ze strony rośliny reakcje, które w wielu przypadkach są identyczne z reakcjami po inokulacji homologicznym szczepem bakterii. Deformacje włośników, w tym tworzenie typowych dla infekcji rizobium lasek pasterskich, obserwowano na korzeniach lucerny, wspanię i *Macroptilium atropurpureum* (RELIC i współaut. 1993, 1994, SPAINK i współaut. 1991). W komórkach mięksiszowych kory korzenia wyki stwierdzono zmiany ultrastru-

kturalne — powstawanie tak zwanych nici preinfekcyjnych, struktur identycznych do tych, jakie obserwowano po inokulacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (van BRUSSEL i współaut. 1992). Stymulacja podziałów komórkowych i tworzenie centrów merystematycznych w sektorach ksylemowych pod wpływem czynników Nod wskazuje na ich udział w aktywacji cyklu komórkowego. Potwierdzają to doniesienia o indukowanej przez czynniki Nod ekspresji genów markerowych cyklu komórkowego w zawieszynie komórkowej lucerny (SAVOURE i współaut. 1994).

Na korzeniach lucerny, wspięgi i *Macroptilium atropurpureum* primordia brodawek powstałe pod wpływem czynników Nod rozwijały się w puste brodawki (pozbawione tkanki bakteroidalnej) o strukturze anatomicznej takiej, jak w brodawkach tworzących się po zakażeniu *Rhizobium* (SPAINK i współaut. 1991, 1993, TRUCHET i współaut. 1991). Stwierdzono również indukujący wpływ czynników Nod na ekspresję niektórych genów nodulinowych (BAUER i współaut. 1994, HORVATH i współaut. 1993). Bakteryjna cząsteczka Nod działa zatem jak sygnał spustowy, który w roślinnym gospodarzu wyzwała kaskadę zdarzeń prowadzących ostatecznie do rozwoju brodawki.

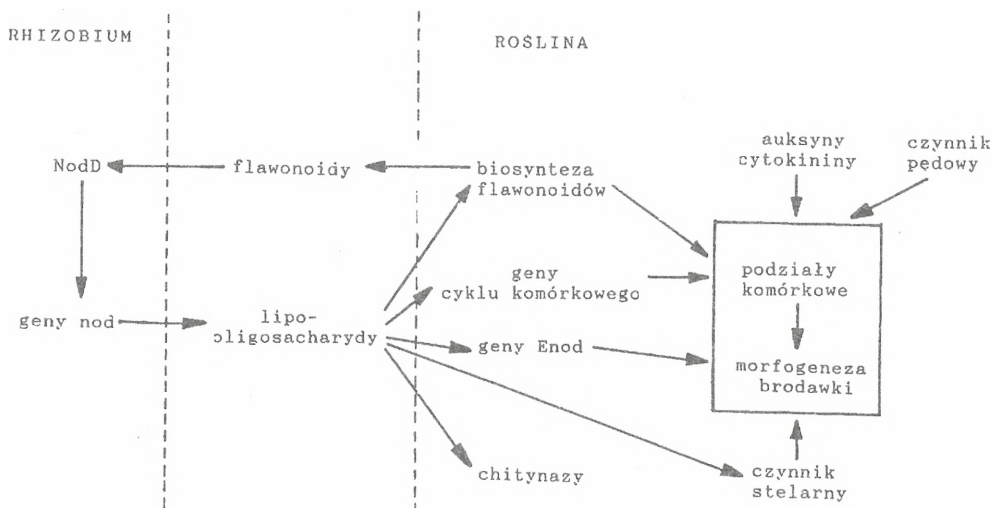
#### JAK ODBYWA SIĘ PERCEPCJA I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU BAKTERYJNEGO?

Wielkość i kompleksowość budowy cząsteczki czynnika Nod wskazuje, że nie jest możliwa jego dyfuzja do wnętrza komórki. Prawdopodobnie w błonach włośników są zlokalizowane receptory, które łącząc się z cząsteczką czynnika Nod uruchamiają drugi sygnał dla morfogenezy brodawki (HIRSCH 1992). Tworzenie „pustych” brodawek bez udziału bakterii, a jedynie pod wpływem egzogennych cytokinin i inhibitorów polarnego transportu auksyn (HIRSCH 1992, RELIC i współaut. 1993) i indukcja w tych brodawkach ekspresji niektórych genów wczesnych nodulin sugerują, że sygnał ten może być natury hormonalnej (HIRSCH i współaut. 1989, van de WIEL i współaut. 1990). Jedynie określone komórki korzenia są kompetentne do jego odbioru i odpowiedzi. Dlaczego tak się dzieje? Według hipotezy zaproponowanej przez Libbengę (LIBBENGA i współaut. 1973) z naczyń protoksylemu do kory korzenia dyfunduje regulator roślinny, tak zwany czynnik stelarny (stela factor). Zmiany jego stężenia w komórkach kory decydują o tym, czy komórki odpowiedzą na sygnał bakteryjny wznowieniem podziałów i utworzą centrum merystematyczne brodawki, czy też nie. Czynnik stelarny został oczyszczony i zidentyfikowany i dzisiaj wiemy już, że jest to urydyna. Jedynie w obecności urydyny komórki kory są zdolne do zareagowania podziałami na zakłócenie roślinnej wewnętrznej równowagi hormonalnej spowodowane przez bakteryjny sygnał — czynnik Nod.

Graficzny model przedstawiony na rysunku 3 powstał w oparciu o zgromadzone do tej pory informacje dotyczące współdziałania rośliny i *Rhizobium* w tworzeniu aktywnego układu symbiotycznego.

Interakcja flawonoidy — białka regulatorowe powoduje, poprzez transkrypcję genów *nod*, syntezę bakteryjnych czynników Nod decydujących o rozpoznaniu właściwego gospodarza roślinnego.

Włączenie programu morfogenezy brodawki odbywa się za pomocą sygnału bakteryjnego (czynnika Nod) i przy udziale hormonów roślinnych i urydyny (czynnika stelarnego). W procesy morfogenetyczne są zaangażowane geny cyklu komórkowego, geny nodulinowe i geny szlaku biosyntezy flawonoidów, których rola w symbiozie nie ogranicza się prawdopodobnie jedynie do indukcji bakteryjnych genów *nod* (HIRSCH 1992).



Rys. 3. Schemat współdziałania czynników kontrolujących wczesne etapy symbiozy *Rhizobium* — rośliny motylkowate (wg SCHULTZE i współaut. 1994, zmienione).

Brodawkowanie roślin jest kontrolowane przez złożony mechanizm autoregulacji obejmujący: inaktywację czynnika stelarnego przez cząsteczki sygnałowe Nod, degradację tych cząsteczek przez roślinne chitynazy, działanie kolejnego regulatora roślinnego, tak zwanego czynnika pędowego (SCHULTZE i współaut. 1994).

## Nod FACTOR — A MOLECULAR SIGNAL IN THE LEGUMINOUS PLANT — *RHIZOBIUM* INTERACTION

### Summary

The soil bacteria — rhizobia — are able to induce formation of a plant organ, the root nodule, in which the bacteria after being transformed into bacteroids are able to reduce molecular nitrogen to ammonia. This symbiosis is highly specific — host plants can only be nodulated by their homologous rhizobia.

Chemical signals produced by both the plant and bacteria play a major role in the specificity of this interaction. Plants secrete phenolic compounds which, by means of NodD protein, induce the expression of bacterial nodulation genes. As a consequence, the rhizobia produce signal molecules — Nod-factors, which trigger the processes involved in the root nodule morphogenesis.

## LITERATURA

- BAUER P., CRESPI M., SZECSI J., ALLISON L. A., SCHULTZE M., RATET P., KONDOROSI E., KONDOROSI A., 1994. *Alfalfa Enod12 genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and Rhizobium invasion*. Plant Physiol. 105, 585-592.
- DICKSTEIN R., BISSELING T., REINHOLD V. N., AUSUBEL F. M., 1988. *Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development*. Genes Dev. 2, 677-687.
- FAUCHER C., MAILLET F., VASSE J., ROSENBERG CH., VAN BRUSSEL A. A. N., TRUCHET G., DENARIE J., 1988. *Rhizobium meliloti host range nodH gene determines production of alfalfa specific extracellular signal*. J. Bacteriol. 170, 5489-5499.
- GLOUDEMANS T., BHUVANESWARI T. V., MOERMAN M., VAN BRUSSEL T., VAN KAMMEN A., BISSELING T., 1989. *Involvement of Rhizobium leguminosarum nodulation genes in gene expression in pea root hairs*. Plant Mol. Biol. 12, 157-162.
- HARTWIG U. A., MAXWELL C. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1989. *Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots*. Plant Physiol. 91, 1138-1142.
- HARTWIG U. A., MAXWELL C. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1990. *Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids on nodABC transcription in Rhizobium meliloti strains containing different nodD genes*. J. Bacteriol. 172, 2769-2773.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. New Phytol. 122, 211-237.
- HIRSCH A. M., BHUVANESWARI T. V., TORREY J. G., BISSELING T., 1989. *Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1244-1248.
- HIRSCH A., MCKIANN H. J., LOBLER M., FANG Y., NINER B., ASAD S., WYCOFF K., ASMANN P. T., JACOBS M., 1993. *Early events in alfalfa nodule development*. Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact. 353-364. Kluwer Academic Publishers.
- HONMA N. A., ASOMANING M., AUSUBEL F. M., 1990. *Rhizobium meliloti nodD genes mediate host-specific activation of nodABC*. J. Bacteriol. 172, 901-911.
- HORVATH B., HEIDSTRA R., LADOS M., MOERMAN M., SPAINK H. P., PROME J. C., VAN KAMMEN A., BISSELING T., 1993. *Lipo-oligosaccharides of Rhizobium induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs*. Plant J. 4, 727-733.
- KRAUSE A., BROUGHTON W. J., 1992. *Proteins associated with root hair deformation and nodule initiation in Vigna unguiculata*. Mol. Plant-Microbe Interact. 5, 96-103.
- LEGOCKI A. B., VERMA D. P. S., 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 sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal*. Nature 344, 781-784.
- LIBBENGA K. R., VAN IREN F., BOGERS R. J., SCHRAAG-LAMES M. F., 1973. *The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in Pisum sativum L.* Planta 114, 29-39.
- MAXWELL C. A., HARTWIG U. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1989. *A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of Rhizobium meliloti*. Plant. Physiol. 91, 842-847.
- PRICE N. P. J., RELIC B., TALMONT F., LEWIN A., PROME D., PUEPPKE S. G., MAILLET F., DENARIE J., PROME J. C., BROUGHTON W. J., 1992. *Broad-host range Rhizobium species strain NGR234 secreted a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated*. Molec. Microbiol. 6, 3575-3586.
- RELIC B., TALMONT F., KOPCIŃSKA 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, 764-773.
- RELIC B., PERRET X., ESTRADA-GARCIA M. T., KOPCIŃSKA J., GOLINOWSKI W., KRISHNAN H. B., PUEPPKE S. G., BROUGHTON W. J., 1994. *Nod-factors of Rhizobium are a key to the legume door*. Mol. Microbiol. 13, 171-178.
- ROLFE B. G., 1988. *Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation*. BioFactors 1, 3-10.
- SAVOURE A., MAGYAR R., PIERRE M., BROWN S., SCHULTZE M., DUDITS D., KONDOROSI A., KONDOROSI E., 1994. *Activation of cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active*



- Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. EMBO J. 13, 1093-1102.
- SCHERES B., van ENGELEN F., van deer KNAAP E., van de WIEL C., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. *Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule*. Plant Cell 2, 687-700.
- SCHULTZE M., KONDOROSI E., RATET P., BUIRE M., KONDOROSI A., 1994. *Cell and molecular biology of Rhizobium — Plant interactions*. Internat. Rev. Cytology. 156, 1-75.
- SPAINK H. P. 1992. *Rhizobial lipo-oligosaccharides, answer and questions*. Plant Molec. Biol. 20, 977-986.
- SPAINK H. P., WIJFFELMAN C. A., PEES E., OKKER R. J. H., LUGTENBERG B. J. J., 1987. *Rhizobium nodulation gene nodD is a determinant of host specificity*. Nature 328, 337-340.
- SPAINK H. P., OKKER R. J. H., WIJFFELMAN C. A., TAK T., GOOSEN-deROO L., PEES E., van BRUSSEL A. A. N., LUGTENBERG B. J. J., 1989. *Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-dependent hybrid nodD product*. J. Bacteriol. 171, 4045-4053.
- SPAINK H. P., SHEELEY D. M., van BRUSSEL A. A. N., GLUSHKA J., YORK W. S., TAK T., GEIGER O., KENNEDY E. P., REINHOLD V. N., LUGTENBERG B. J. J., 1991. *A novel highly unsaturated fatty acids moiety of lipo-oligosaccharide signal determines host specificity of Rhizobium*. Nature 354, 125-130.
- SPAINK H. P., WIJFJES A. H. M., van VLIET T. B., KIJNE J. W., LUGTENBERG B. J. J., 1993. *Rhizobial lipo-oligosaccharide signals and their role in plant morphogenesis; are analogous lipophilic chitin derivatives produced by the plant?* Aust. J. Plant Physiol. 2, 381-392.
- TRUCHET G., ROCHE P., LEROUGE P., VASSE J., CAMUT S., de BILLY F., PROMÉ J. C., DENARIE J., 1991. *Sulphated lipo-oligosaccharide signals of Rhizobium meliloti elicit root nodule organogenesis in alfalfa*. Nature 351, 670-673.
- van BRUSSEL A. A. N., BAKHUIZEN R., van SPRANSEN P. C., SPAINK H. P., TAK T., LUGTENBERG B. J. J., KIJNE J. W., 1992. *Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium*. Science 257, 70-72.
- van de WIEL C., NORRIS J. H., BOCHENEK B., DICKSTEIN R., BISSELING T., HIRSCH A. M., 1990. *Nodulin gene expression and ENOD2 localization in the effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria free nodules of alfalfa*. Plant Cell 2, 1009-1017.
- van de WIEL C., SCHERES B., FRANSSSEN H., van LIEROP M. J., van LAMMEREN A., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. *The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules*. EMBO Journal 9, 1-7.