

Hanna JAŚKOWSKA

Katedra Mikrobiologii Rolniczej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

PARA-BRODAWKI JAKO NOWY MODEL SYMBIOZY

Powszechnie jest znane zjawisko symbiozy pomiędzy roślinami z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*) i bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium*. W wyniku symbiozy na korzeniach czy łodygach roślin rozwijają się brodawki, w których wewnątrzkomórkowo usytuowane bakterie przeprowadzają proces wiązania azotu atmosferycznego. Związany azot wydzielają do komórek gospodarza co sprawia, że roślina staje się niezależna od azotu glebowego. Jednak uprawa większości roślin — w tym ważnych z ekonomicznego punktu widzenia zbóż — wymaga bardzo kosztownego nawożenia azotowego.

Odkrycie symbiozy pomiędzy niemotylkowatymi roślinami z *Parasponia* i *Rhizobium* (TRINICK 1973) oraz kilkudziesięcioma roślinami niemotylkowatymi i promieniowcami z rodzaju *Frankia* (BECKING 1970), a także stwierdzenie znacznych różnic w szczegółach interakcji symbiotycznej i morfologii brodawek u różnych gatunków roślin motylkowatych zasugerowało, że symbiotyczne wiązanie N_2 może być rozszerzone na rośliny niemotylkowate. Z oceny możliwości wykonania tego zadania wynikało, że najlepszym wariantem będzie przeniesienie genów *nif* wraz z innymi, koniecznymi do wiązania azotu, do chloroplastów roślinnych (POSTGATE 1987). Niestety, do tej pory nie udało się wyposażać roślin za pomocą inżynierii genetycznej w działający, transgeniczny układ symbiotyczny, wiążący N_2 . Główną przeszkodą jest złożoność genetycznej regulacji tego procesu (QUISPEL 1991).

W ostatnich latach obserwuje się nowe, niegenetyczne podejście do rozszerzenia symbiozy na inne rośliny. ALOYSIUS i PATON (1984) stosowali do zakażania roślin protoplasty bakterii. Powszechnie uważa się, że protoplasty mogą penetrować ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną żywych komórek. Po zastosowaniu protoplastów *Azotobacter*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus polymyxa* i *Beijerinckia* autorzy uzyskali dowody na aktywność bakterii w tkankach roślinnych, niestety aktywności nitrogenazy — kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za wiązanie N_2 — nie badali.

Inną możliwość stworzyło wykorzystanie enzymów hydrolitycznych do degradacji ściany komórkowej roślin. COCKING i współpracownicy (za KENNEDY i TCHAN 1992) doprowadzili do powstania asocjacji pomiędzy zbożami a *Rhizobium* spp. niszcząc enzymatycznie bariery uniemożliwiające wniknięcie bakterii do roślin.

Po zastosowaniu celulaz i pektynaz autorzy obserwowali gwałtowną degradację ścian komórkowych wierzchołka wzrostu włośników u roślin motylkowatych i zbóż. Brodawki powstawały na 10% siewek ryżu potraktowanych enzymami i *Rhizobiami*. Gdy nie stosowano enzymów, brodawki nie tworzyły się.

Lepsze wyniki — wzrost liczby brodawek — uzyskali ALL-MALLAH i współautorzy (1989) łącząc działanie enzymów z glikolem polietylenowym. Doświadczenia przeprowadzali na siewkach ryżu szczepionych *Rhizobium*. Obserwowali powstawanie brodawek, w których bakterie zasiedlały głównie przestrzenie międzykomórkowe. Podobne badania były prowadzone na siewkach pszenicy i rzepaku. We wszystkich przypadkach aktywność redukcji acetyleny (ARA) była ledwie wykrywalna.

Jeszcze inną metodę uzyskiwania brodawek opisali JING i współautorzy (1990). Obserwowali powstawanie struktur brodawkopodobnych na korzeniach jęczmienia szczepionego *Rhizobium* w efekcie działania pola magnetycznego. W obserwowanych strukturach była obecna nić infekcyjna i bakteroidy otoczone błoną peribakteroidalną; nie stwierdzili w nich jednak ARA. Ponieważ doświadczenie nie było obwarowane odpowiednimi kontrolami inni autorzy podchodzą do wyników uzyskanych przez JINGA i współpracowników bardzo krytycznie.

Na początku lat osiemdziesiątych NIE i współpracownicy (za KENNEDY i TCHAN 1992) z Uniwersytetu Shandong w Chinach opublikowali szereg prac donoszących o indukowaniu kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D) brodawek na korzeniach wielu roślin. Wcześniej, w latach czterdziestych i pięćdziesiątych, opisano powstawanie takich struktur u roślin po traktowaniu herbicydami, bez rozpatrywania, czy struktury te są zasiedlone przez bakterie i jakie jest ich znaczenie dla roślin. NIE i współpracownicy udowodnili, że są one odpowiedzią na działanie herbicydu i powstają niezależnie od szczepienia roślin bakteriami.

Inny badacz chiński — CHEN — (za KENNEDY i TCHAN 1992) potwierdził rezultaty NIE i opisał wiązanie N_2 (na niskim poziomie) w strukturach indukowanych 2,4-D u pszenicy szczepionej *Azorhizobium caulinodans*.

Prace Chińczyków były publikowane w czasopiśmie chińskich, niedostępnych dla większości badaczy, w związku z tym przez pewien okres czasu nie były znane.

W 1989 roku KENNEDY i TCHAN opublikowali artykuł przeglądowy na temat indukcji struktur brodawkopodobnych przez 2,4-D. Zawarli w nim opis osiągnięć badaczy chińskich i przedstawili własne wyniki. W pracy tej po raz pierwszy struktury brodawkopodobne indukowane chemicznie zostały nazwane para-nodules (para-brodawki) dla odróżnienia od brodawek powstających naturalnie na korzeniach roślin motylkowatych. Opublikowanie wyników prac Chińczyków w bardziej dostępnych czasopiśmie dało początek szeregu badań zmierzających w dwu kierunkach. Pierwszy kierunek to próby rozszerzenia symbiozy *Rhizobium* na rośliny nie dające w naturalnych warunkach brodawek z tymi bakteriami. Większość z tych prac była prowadzona na pszenicy. BENDER, NIE i KENNEDY (za KENNEDY i TCHAN 1992) stwierdzili niezależnie, że u wszystkich roślin poddanych działaniu 2,4-D powstawały p-brodawki zasiedlone w 10%–20% przez szczepionkowe bakterie z rodzaju *Rhizobium*. Bakterie można było znaleźć w przestrzeniach międzykomórkowych i w komórkach bez normalnej cytoplazmy. P-brodawki nie miały organizacji wewnętrznej i nie stwierdzano

w nich redukcji C_2H_2 , choć autorzy przebadali wiele szczepów i oznaczenia prowadzili przy kontrolowanym ciśnieniu O_2 .

AKAO i współpracownicy (1991) podjęli próbę uzyskania p-brodawek indukowanych 2,4-D na odmianie soi nie tworzącej brodawek. Do szczepienia roślin zastosowali mieszanke szczepów *Bradyrhizobium japonicum*. Powstałe brodawki miały normalną wewnętrzną strukturę i były zabarwione na kolor czerwony, wewnątrzkomórkowo występowały w nich bakteroidy. Natomiast inny od naturalnego był ich kształt —tykwopodobny — i często występowały parami. Obserwowano w tych brodawkach wysoki poziom wiązania N_2 .

Drugi kierunek badań to próby ustanowienia nowego rodzaju symbiozy. Wywodzi się on ze znajomości faktu, że bakterie dwuazotoficzne z rodzaju *Azotobacter*, *Xantobacter*, *Bacillus* i *Azospirillum* w naturalnych warunkach wchodzi w układy asocjacyjne z roślinami i mogą kolonizować wnętrza korzeni. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* żyją w asocjacji między innymi z roślinami zbożowymi i właśnie z zastosowaniem ich wiąże się nadzieje na wzrost plonów. Wielokrotnie podejmowano próby szczepienia roślin tymi bakteriami i w większości przypadków uzyskiwano pozytywne wyniki. Badacze sugerują, że korzystny wpływ *Azospirillum* na rośliny jest powodowany przez wydzielanie substancji biologicznie czynnych, usprawnienie pobierania wody i soli mineralnych, a także wiązanie N_2 . ZEMAN i współpracownicy (1991) stwierdzili, że właśnie p-nodule z *Azospirillum* mogą dostarczyć nowego modelu wiązania azotu atmosferycznego w symbiozie z roślinami niemotylkowatymi.

TCHAN, ZEMAN i KENNEDY prowadzą od początku lat dziewięćdziesiątych niezależne badania nad indukcją 2,4-D p-brodawek i szczepieniem roślin niemotylkowatych bakteriami z rodzaju *Azospirillum*. W przeciwieństwie do doświadczeń z roślinami szczepionymi *Rhizobium* u pszenicy w p-brodawkach zasiedlonych przez *Azospirillum* obserwowali redukcję acetylenu. U roślin szczepionych bakteriami ale nie traktowanych 2,4-D poziom redukcji acetylenu był 5-krotnie niższy, dużo gorsza była też powtarzalność wyników. Wstępne badania wykazały bezpośrednie powiązanie fotosyntezy i redukcji acetylenu w p-brodawkach. Zastosowanie inhibitorów fotosyntezy hamowało redukcję C_2H_2 . Może to świadczyć o spełnieniu w tym układzie pierwszego warunku symbiozy, jakim jest czerpanie korzyści przez mikrosymbionta.

Bakterie dwuazotoficzne kolonizujące korzenie w przeciwieństwie do symbiotycznych nie wydzielają do środowiska azotu związanego, dlatego też tylko w niewielkim stopniu zaspakajają zapotrzebowanie rośliny na ten pierwiastek. Azot związany przez bakterie asocjacyjne pozostaje głównie w ich komórkach i dostępny staje się dla roślin dopiero po obumarciu bakterii i mineralizacji substancji organicznej w nich zawartej.

CHRISTIANSEN-WENIGER i VAN VEEN (1991) uzyskali spontaniczne mutanty *Azospirillum brasilense*, które wydzielają do środowiska jony amonowe. Mutanty te wiązały azot nawet w obecności jonów amonowych, a w podłożu bezazotowym wiązały 2-krotnie więcej azotu niż szczepy dzikie. Bakterie te zastosowali do szczepienia siewek pszenicy i kukurydzy (CHRISTIANSEN-WENIGER i VANDERLEYDEN 1994) po indukcji 2,4-D brodawek. Uzyskali brodawki zasiedlone przez stabilną populację *Azospirillum*. U kukurydzy tworzyły się one na korzeniu głównym, zniekształceniu ulegał też wierzchołek korzenia. Jednocześnie obserwowano

zahamowanie elongacji korzenia głównego i tworzenia korzeni bocznych. Po przeniesieniu roślin do podłoża bez 2,4-D młode p-brodawki rosły i rozwijały się w dojrzałe organy. W czasie 5-tygodniowej obserwacji nie wykazywały oznak starzenia się czy obumierania. Rośliny w tym czasie wykształciły drugi, działający równolegle system korzeniowy.

P-brodawki różniły się strukturą i pochodzeniem od brodawek u roślin motylkowatych przede wszystkim centralnie umieszczoną wiązką przewodzącą. Histologicznie porównywalne były do brodawek na pędach *Sesbania*. Bakterie kolonizujące p-brodawki były przytwierdzone do błon komórkowych i połączone ze sobą substancją fibrylarną niewiadomego pochodzenia. Zasiedlały komórki roślinne bez ich widocznego uszkodzenia.

Wstępne badania ze znakowanym $^{15}\text{N}_2$ wykazały, że wydzielające jony amonowe mutanty *Azospirillum brasilense*, obecne w p-brodawkach pszenicy i kukurydzy, przekazują znaczne ilości związanego N_2 roślinie-gospodarzowi.

Powyższe obserwacje były poczynione na siewkach i roślinach zaledwie kilkutygodniowych, nie wiadomo czy uzyskane wyniki można odnieść do starszych roślin. Czy populacja bakterii wewnątrz p-brodawek będzie stabilna w późniejszym okresie życia rośliny i czy roślina przez cały czas będzie czerpać korzyści z tego typu współżycia wykażą późniejsze badania.

Obecnie wiadomo, że stosując 2,4-D bardzo łatwo można uzyskać p-brodawki. Proces powstawania ich nie jest zależny od obecności bakterii. Jakkolwiek bakterie szczepionkowe mogą wpływać na liczbę p-brodawek i mogą modyfikować ich kształt. Mechanizm, poprzez który 2,4-D indukuje powstawanie tych struktur nie jest znany. Nie może być wynikiem prostej aktywności auksynopodobnej tej substancji. Być może 2,4-D inicjuje proces/procesy porównywalne z tymi, które indukują *Rhizobia* podczas normalnego brodawkowania. Dodatkowo może ułatwiać bakteriom penetrowanie tkanek roślinnych przez stymulację produkcji celulaz bakteryjnych (za AKAO i współaut. 1991). Wiązanie azotu atmosferycznego w p-brodawkach zależy głównie od stopnia ich zasiedlenia przez *Azospirillum* i wydaje się, że zachodzi nawet intensywniej niż w brodawkach normalnych. Pewne wątpliwości budzi to, czy aktywność redukcji acetylenu jest wynikiem tylko działalności bakterii zasiedlających p-brodawki, czy pochodzi także od bakterii bytujących na powierzchni korzeni.

Opisane doświadczenia są prowadzone zaledwie od kilku lat. Trudno jest w tej chwili określić, czy uzyskany model symbiozy pomiędzy roślinami zbożowymi i *Azospirillum* można faktycznie uznać za prawdziwą symbiozę. Obserwacje były poczynione na siewkach i kilkutygodniowych roślinach, nie wiadomo czy uzyskane wyniki można odnieść do starszych roślin. Wyjaśnienia wymaga mechanizm ewentualnego przekazywania związanego przez bakterie N_2 roślinom. Na podstawie dotychczasowych wyników nie można też stwierdzić, czy p-brodawki i populacja bakterii zasiedlających je będą stabilne i czy roślina będzie czerpać z tego typu współżycia korzyści także w późniejszym okresie życia.

Odległe jeszcze ale wielce prawdopodobne wydaje się zastosowanie technologii uzyskiwania p-brodawek w rolnictwie. Możliwe, że wcześniej powinna być ona zastosowana w ogrodniczych uprawach hydroponicznych. Przedtem jednak należy znacznie lepiej poznać ten problem i odpowiedzieć na pytania, które zrodziły się w trakcie prowadzonych dotychczas badań.

PARA-NODULES AS A NEW MODEL OF SYMBIOSIS

Summary

A N_2 -fixing symbiosis is a specific of plants of the *Fabaceae* family. Within this relationship the plant develops, along roots or stems nodules in which the symbiotic bacteria fix atmospheric nitrogen. This process is very efficient, and makes the plant independent of mineral nitrogen.

Most of the plants, including important crops, do not form nodules, and their productivity depends on N fertilization. Recent technical advances concerning the induction of nodular structures (para-nodules) on the roots of cereal crops offer the prospect that dependable symbiosis with free-living diazotrophs, such as *Azospirillum*, or with *Rhizobium* may eventually be achieved.

LITERATURA

- AKAO S., NAKATA S., YONEYAMA T., 1991. Formation of nodules on non-nodulating soybean T201 after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Plant and Soil* 138, 207–212.
- ALL-MALLAH M. K., DAVEY M. R., COCKING E. C., 1989. Formation of nodular structures on rice seedlings by rhizobia. *J. Exp. Bot.* 40, 473–478.
- ALOYSIUS S. K. D., PATON A. M., 1984. Artificially induced symbiotic associations of L-form bacteria and plants. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 465–477.
- BECKING H. J., 1970. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants. *Plant and Soil* 32, 611–654.
- CHRISTIANSEN-WENIGER C., VANDERLEYDEN J., 1994. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. *Biol. Fertil. Soils* 17, 1–8.
- CHRISTIANSEN-WENIGER C., VAN VEEN J. A., 1991. NH_4^+ -excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3006–3012.
- JING Y., ZHANG B. T., SHAN X. Q., 1990. Pseudonodules formation on barley roots induced by *Rhizobium astragali*. *FEMS Microbiol. Lett.* 69, 123–127.
- KENNEDY I. R., TCHAN Y. T., 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops. Recent advances. *Plant and Soil* 141, 93–118.
- POSTGATE J., 1987. Prospects for the improvement of biological nitrogen fixation. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* 85s–91s.
- QUISPEL A., 1991. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. *Plant and Soil* 137, 1–11.
- TRINICK M. J., 1973. Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume *Trema aspera*. *Nature* 144, 459.
- ZEMAN A., TCHAN Y. T., KENNEDY I. R., 1991. The para-nodule on wheat as a model of N_2 -fixing symbiosis on a non-legume. *Proc. 9th Aust. Nitrogen Fixation Conf.* 9, 80–81.