

BARBARA ŁOTOCKA, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa,

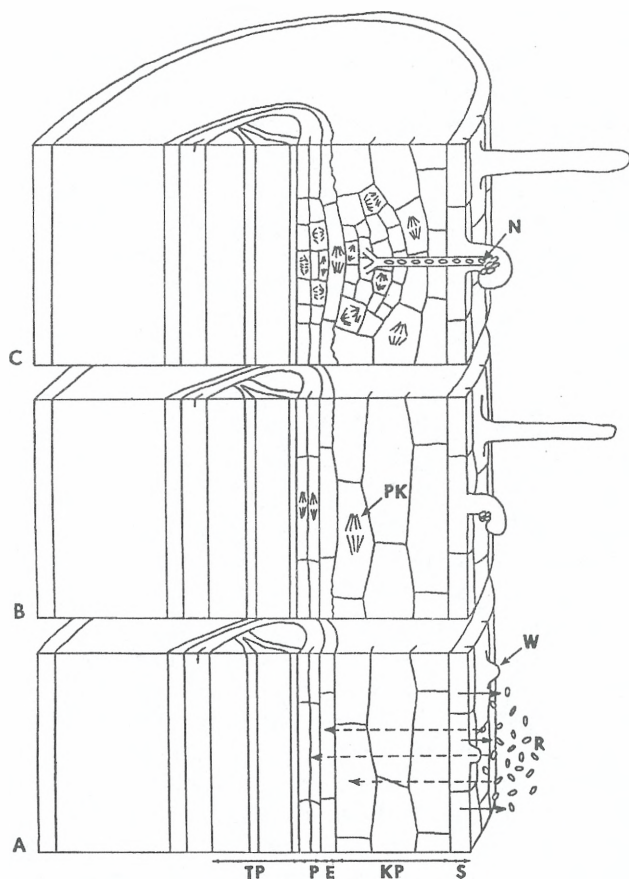
POWSTAWANIE I ROZWÓJ BRODAWEK KORZENIOWYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Powstawanie brodawek korzeniowych u roślin motylkowatych jest przykładem organogenezy następującej wyłącznie pod wpływem specyficznego bodźca ze środowiska zewnętrznego rośliny. Bodźcem tym jest, mówiąc w dużym skrócie myślowym, obecność w ryzosferze odpowiedniej dla danego gatunku rośliny bakterii symbiotycznej z rodzaju *Azorhizobium*, *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium*. O naturze sygnałów wymienianych przez obydwu uczestników symbiozy traktują dwa inne artykuły zamieszczone w tym zeszycie *Kosmosu*, niniejsza zaś praca, omawiająca morfogenezę brodawek korzeniowych, ma na celu ułatwienie zrozumienia ich treści.

PROCES INFЕКCJI

Warunkiem wstępnym wejścia w symbiozę konkretnego osobnika rośliny gospodarza i żyjącej w jej ryzosferze populacji rizobiów jest wzajemne rozpoznanie. Polega ono na wymianie bodźców o charakterze chemicznym i jest omówione w pracy J. Kopcińskiej i W. Golinowskiego w tym zeszycie. Efektem rozpoznania gospodarza przez rizobia jest kolonizacja przez nie młodych, wyrastających włośników korzeniowych (HIRSCH 1992). Obecność mikrokolonii bakterii na powierzchni młodego włośnika powoduje zmianę ukierunkowania jego wzrostu i — co za tym idzie — jego deformację (rys. 1A). Zniekształcenie może polegać na rozdęciu włośnika lub jego rozgałęzieniu, ale skuteczna infekcja może nastąpić tylko, gdy dojdzie do skręcenia włośnika i obrośnięcia przezeń mikrokolonii rizobiów. Kolejny etap rozwoju symbiozy polega na wytworzeniu przez roślinę specyficznych wrót infekcji, umożliwiających wejście rizobiów do wnętrza ciała rośliny w taki sposób, że nie „rozchodzą się” one w nim w sposób dowolny, ale docierają najkrótszą drogą do specjalnie dla nich przygotowanej niszy ekologicznej — zawiązka brodawki korzeniowej, którego wytwarzanie następuje równolegle z postępowaniem infekcji. Owe specyficzne wrota infekcji to tak zwana nić infekcyjna, którą można porównać do trans-komórkowego tunelu, mającego

swój początek w bezpośrednim sąsiedztwie obrośniętej przez włosnik kolonii rizobiów i rosnącego poprzez komórki kory pierwotnej korzenia ku zawiązkowi brodawki. Ściana nici infekcyjnej jest podobna do ściany komórkowej, a matriks ją wypełniająca — do blaszki środkowej (BREWIN i współaut. 1993), jest ona podłożem dla rizobiów, wnikaających do wnętrza nici. W jaki sposób bakterie wnikaają do nici nie jest rozstrzygnięte — może to następować albo poprzez inwaginację ściany — swoisty wzrost ściany do wnętrza włosnika, albo wskutek rozpuszczenia fragmentu ściany blokującego wejście do dobudowanej do ściany nici, albo w wyniku kombinacji obu procesów. Kierunek wydłużania nici infekcyjnej jest, jak się wydaje, wyznaczany przez tak zwane struktury pre-infekcyjne — grube cytoplazmatyczne mosty w komórkach kory, często zawierające jądro komórkowe (van BRUSSEL i współaut. 1992). Ostatecznie nić infekcyjna wrasta do niektórych komórek zawiązka brodawki i tam wreszcie są uwalniane z niej bakterie.



Rys. 1. Powstawanie zawiązka brodawki korzeniowej: A — wymiana sygnałów między rośliną i bakterią; B — obrastanie kolonii bakterii przez wydłużający się włosnik, podziały komórek w głębi korzenia; C — penetracja zawiązka brodawki przez nić infekcyjną. Skróty: S — skórka korzenia, KP — kora pierwotna korzenia, E — endoderma, P — perycykl, TP — tkanka przewodząca walca osiowego korzenia, W — włosnik, R — komórki rizobiów, PK — podział komórki, N — nić infekcyjna.

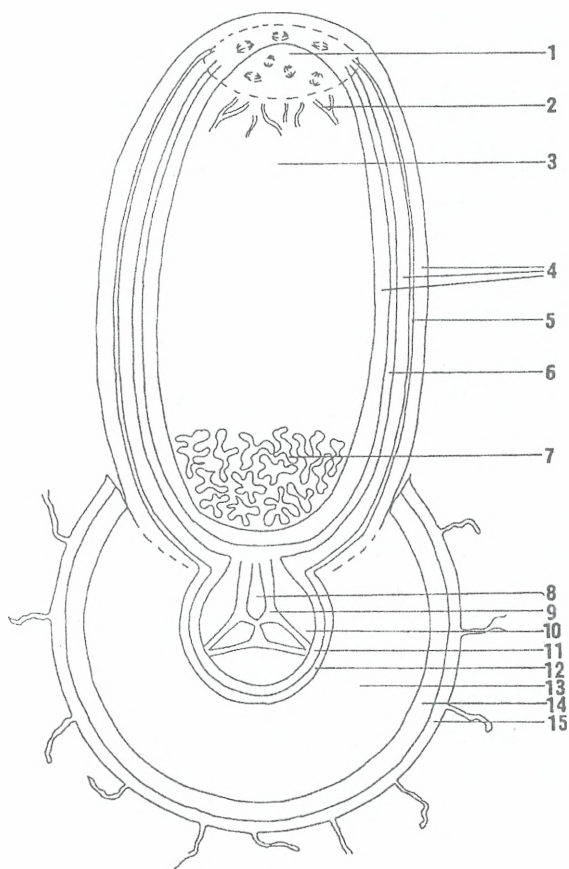
POWSTAWANIE ZAWIĄZKA BRODAWKI KORZENIOWEJ

Ciągle jeszcze brak jest danych o tym, w jaki sposób sygnał o obecności rizobiów jest przez roślinę odbierany i w jaki sposób przekazywany w jej ciele. Częsteczki chemicznego bodźca wysyłane przez bakterie nie są wykrywane wewnątrz tkanek gospodarza, muszą więc być rozpoznawane przez receptor na jego powierzchni, uruchamiający system „przełączników”, przez które sygnał dociera do komórek kompetentnych do jego odbioru i jednocześnie odpowiedzi. Odpowiedź — to uruchomienie informacji genetycznej, w której jest zapisany program wytworzenia brodawki korzeniowej. Przejawem rozpoczęcia realizacji tego programu jest odzyskanie zdolności dzielenia się przez komórki kory pierwotnej, endodermy i perycyklu korzenia sąsiadujące z protoksylem wiązki drewna pierwotnego, leżącej najbliżej miejsca infekcji (rys. 1B) (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Najintensywniej dzielą się komórki kory pierwotnej i tylko w tej strefie spośród trzech pobudzonych odróżnicowanie obejmuje stopniowo inne komórki, coraz dalej położone od pierwotnego „centrum indukcji”. Równocześnie z podziałami komórek tworzącego się zawiązka brodawki rośnię w jego kierunku nie infekcyjna (rys. 1C). W obrębie zawiązka może się ona rozgałęzić i wnikać do kilku komórek. Komórki te, z chwilą uwolnienia w nich bakterii z nici infekcyjnej, staną się pierwszymi komórkami tkanki bakteroidalnej brodawki korzeniowej.

ORGANIZACJA BRODAWKI KORZENIOWEJ

W pełni wykształcona brodawka korzeniowa jest organem o skomplikowanej budowie (rys. 2). Komórki zewnętrznych warstw brodawki (kora brodawki) nie są zainfekowane przez rizobia i pełnią funkcje ochronne (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Zewnętrzna część kory brodawki jest zbudowana ze stosunkowo luźno ułożonych komórek parenchymatycznych. Pod nimi znajduje się pojedyncza warstwa szybko obumierających komórek o zdrewniałych ścianach, a jeszcze głębiej — kilka warstw komórek miękkiszowych, charakteryzujących się nieco mniejszymi rozmiarami i brakiem lub niewielkimi przestrzeniami komórkowymi. Warstwy korowe brodawki chronią ją nie tylko przed inwazją patogenów lub wysychaniem, ale także stanowią barierę ograniczającą dyfuzję tlenu do wnętrza brodawki, którego nadmiar powoduje nieodwracalną inaktywację nitrogenazy. W wewnętrznych warstwach kory brodawki przebiegają wiązki przewodzące. Zawierają one elementy floemu i ksylemu oraz komórki perycyklu (w tym komórki transferowe) i są otoczone jednowarstwową endodermą z pasemkami Caspary'ego. Wiazki brodawki łączą się z systemem przewodzącym korzenia, a endoderma wiązek jest ciągła z endodermą korzenia (i identyczna z nią pod względem budowy). W wierzchołkowej części brodawki, chroniony bardzo cienką w tym miejscu i nie zawierającą zdrewniałych komórek korą, znajduje się merystem brodawki. Ontogenetycznie jest on pochodną merystematycznego zawiązka brodawki, powstałą z nie zainfekowanych komórek zawiązka. Mery-

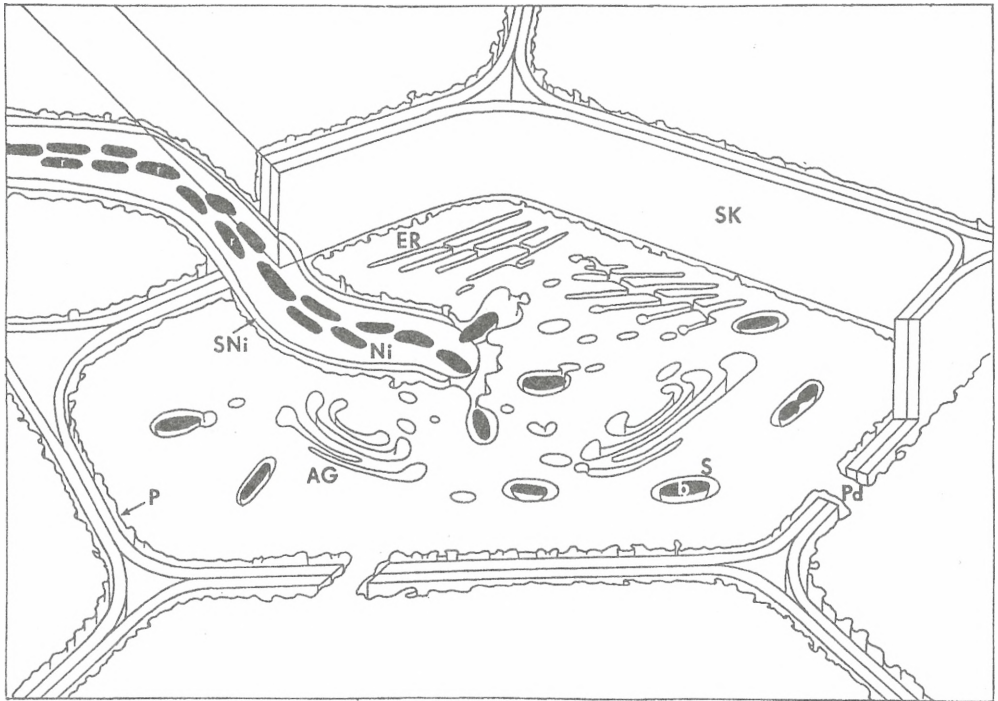
stem brodawki odpowiada za przyrost wszystkich tkanek brodawki, jego pochodne odkładane na zewnątrz różnicują się w komórki wiązek przewodzących i poszczególnych warstw kory, pochodne odkładane ku wnętrzu brodawki podlegają infekcji i różnicują się w komórki tkanki bakteroidalnej. Infekcja następuje w warstwie komórek leżących bezpośrednio pod merystemem (tzw. strefa penetracji nici infekcyjnych), polega na wrastaniu nici infekcyjnych do pochodnych merystemu i uwalnianiu do nich bakterii.



Rys. 2. Budowa brodawki korzeniowej typu niezdeterminowanego: 1 — rejon merystematyczny brodawki, 2 — rejon penetracji nici infekcyjnych, 3 — dojrzała tkanka bakteroidalna, 4 — miękisz kory brodawki, 5 — zdrewniałe komórki w korze brodawki, 6 — wiązka przewodząca, 7 — strefa degradacji tkanki bakteroidalnej, 8 — drewno, 9 — kambium, 10 — łyko, 11 — perycykl, 12 — endoderma, 13 — kora pierwotna korzenia, 14 — egzoderma, 15 — skórka.

Zakończenie nici infekcyjnej, penetrującej komórkę, nie jest otoczone ścianą, zatem matriks nici, w której namnażają się rizobia jest w kontakcie z plazmolemą komórki gospodarza (rys. 3). Komórki bakterii wychodzące z nici podlegają endocytozie — plazmolema wpukla się wokół komórki rizobium i zamyka ją w pęcherzyku, który oddziela się od plazmoemy i przemieszcza się do wnętrza cytoplazmy komórki. W procesie endocytozy bakterii istotną rolę odgrywa endo-

plazmatyczne retikulum i aparaty Golgiego komórki gospodarza, wnioskując z licznych ich profili, obserwowanych zawsze w pobliżu końca nici. Można domyślać się, że dostarczają one błon i ich składników do odbudowy kurczącej się plazmolemy i powiększającej się powierzchni pęcherzyków zamykających bakterie.



Rys. 3. Uwalnianie bakterii z nici infekcyjnych. Skróty: Ni — nić infekcyjna, SNi — ściana nici infekcyjnej, r — pałeczkowate rizobia, S — symbiosom, b — bakteroid, ER — endoplazmatyczne retikulum, AG — aparat Golgiego, P — plazmolema, Pd — plazmodesma, SK — ściana komórkowa.

Błona otaczająca bakterię (zwana błoną peribakteroidalną) podlega modyfikacji — między innymi zostają do niej włączone pewne białka konieczne do prawidłowego funkcjonowania nowo powstałego tworów — niby-organellum, zwanego symbiosomem. Modyfikacji podlega także sama komórka bakteryjna — przekształca się w bakteroid. Zmienia się jej wielkość (rośnie) i kształt (z pałeczkowatego w formy liter T, X, Y) oraz ulegają w niej ekspresji geny charakterystyczne dla tego etapu symbiozy. Takie przekształcenie jest ślepą uliczką ontogenezy — choć bakteroidy mogą jeszcze dzielić się, to nie stwierdzono, by były zdolne do powrotu do stanu saprofitycznie żyjącej pałeczki. Wśród genów bakteryjnych podlegających ekspresji po przekształceniu się bakterii w bakteroid są geny kodujące podjednostki nitrogenazy — kompleksu enzymatycznego redukującego azot cząsteczkowy do amoniaku. Jest on eksportowany do cytoplazmy komórki gospodarza w postaci jonu amonowego i tam włączany do związków organicznych, po czym opuszcza brodawkę wraz z prądem ksylemowym.

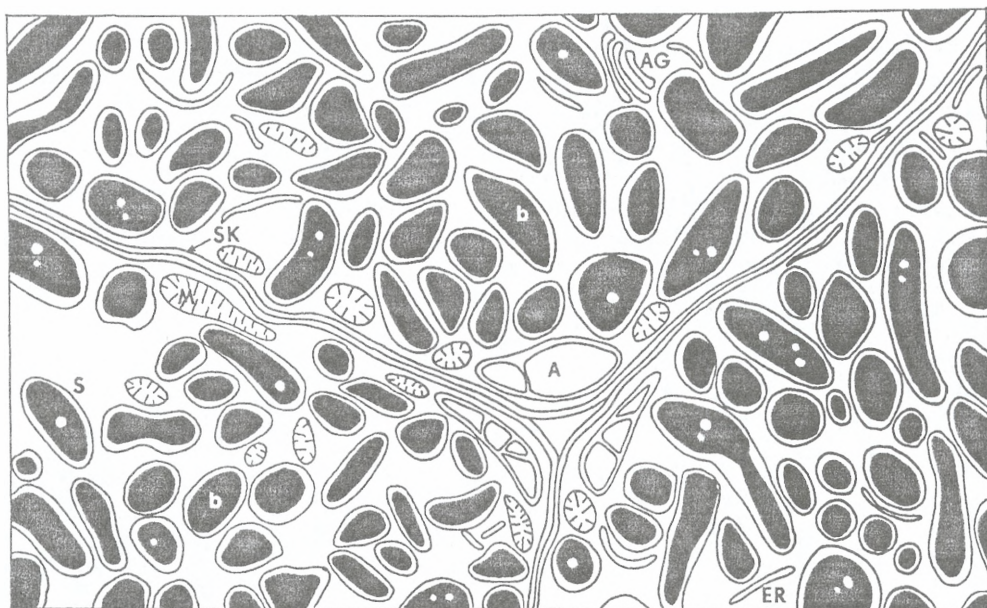
Nitrogenaza, jak już wspomniano, jest wrażliwa na tlen. Ważnym elementem jej ochrony przed nieodwracalną inaktywacją jest leghemoglobina — hemoproteid, którego ekspresja jest skorelowana z ekspresją genów nitrogenazy w rizobiach przekształcających się w bakteroidy. Leghemoglobina jest jedną z wielu nodulin — roślinnych białek brodawkowo-specyficznych, to jest takich, które pojawiają się tylko w brodawkach korzeniowych lub ich ekspresja jest w brodawkach wzmożona (więcej informacji o nodulinach w artykule J. Kopcińskiej i W. Golinowskiego w tym zeszycie). Obecność leghemoglobiny pozwala rozwiązać sprzeczność „interesów” systemów oddychania komórkowego bakterii i rośliny gospodarza wymagających niezakłóconych dostaw tlenu oraz systemu nitrogenazy, wymagającej ochrony przed wysokim stężeniem tlenu. Leghemoglobina, która ma wysokie powinowactwo do tlenu, wiąże jego cząsteczki i utrzymuje jego stężenie na poziomie pozwalającym na funkcjonowanie łańcucha oddechowego, a jednocześnie nie toksycznym dla nitrogenazy.

Dojrzała tkanka bakteroidalna zawiera dwa typy komórek — niezainfekowane i zainfekowane. Pierwsze układają się w rozgałęzione sznury przenikające obszar tkanki bakteroidalnej, drugie są upakowane pomiędzy nimi. Komórki niezainfekowane mają zwykle dużą wakuolę i niezbyt gęstą cytoplazmę, ich rola nie jest dokładnie poznana. Komórki zainfekowane są duże, słabo zwakuolizowane lub nawet pozbawione wakuol, cytoplazma jest wypełniona symbiosomami, pomiędzy którymi układają się cysterny szorstkiego endoplazmatycznego retikulum i aparaty Golgiego (rys. 4). Większość mitochondriów i amyloplastów jest zlokalizowana w przyściennej warstwie cytoplazmy, zwłaszcza w sąsiedztwie niezbyt w tej tkance dużych przestrzeni międzykomórkowych. Ściana komórkowa ma charakter pierwotny, jest cienka i występują w niej liczne plazmodesmy. Jądro komórkowe jest duże i zlokalizowane centralnie, a zawartość DNA jądrowego często przewyższa poziom charakterystyczny dla diploidalnych komórek danego gatunku (MITCHELL 1965). Tkanka bakteroidalna jest miksoploidalna, większość jej komórek przechodzi jeden lub więcej cykli endoreplikacyjnych (takie zjawisko często dotyczy tkanek lub komórek roślinnych o szczególnej intensywności określonych procesów metabolicznych (NAGL 1978).

W dojrzałych komórkach tkanki bakteroidalnej nadal są widoczne nici infekcyjne, które wrosły do nich, gdy komórki te znajdowały się jeszcze w strefie merystematycznej brodawki (NEWCOMB 1981). W niciach nadal są widoczne komórki rizobiów, z których większość nie wykazuje żadnych objawów sugerujących ich degradację. Utrzymywanie się wewnątrz brodawki takiej wewnątrznicowej populacji rizobiów w saprofitycznym stadium ich rozwoju jest zjawiskiem o zasadniczym znaczeniu z punktu widzenia interesów bakteriynego partnera symbiozy. Mikrokolonia bakterii, wchodząc w symbiotyczny układ z rośliną, rozmnaża się w ciele rośliny (w brodawce korzeniowej), unikając konkurencji pokarmowej z innymi mikroorganizmami glebowymi. Pamiętać jednak należy, że ogromna większość osobników bakterii żyjących w brodawce to bakteroidy, niezdolne do samodzielnego bytowania w glebie.

Najstarsze, najbardziej oddalone od szczytowo położonego merystemu komórki tkanki bakteroidalnej po kilku-kilkunastu dniach od zainfekowania zaczynają wykazywać objawy starzenia się (rys. 5). Objawy te mogą pojawiać się najpierw w „strefie bakterii”, obserwuje się wtedy łączenie membran peribakte-

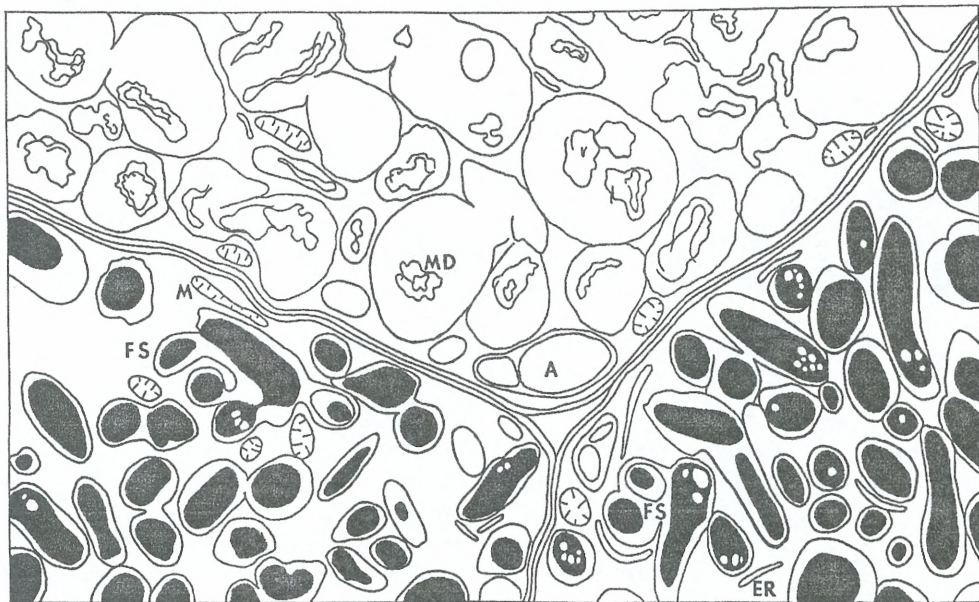
roidalnych poszczególnych symbiosomów i lizę bakteroidów przy stosunkowo nie zmienionej cytoplazmie gospodarza; może też być odwrotnie — elementy „strefy rośliny” — protoplastu gospodarza — mogą podlegać lizie wcześniej niż symbiosomy (GOLINOWSKI i współaut. 1987). Ostateczny obraz jest w obu przypadkach podobny — komórki wypełniają „membrany-uchy” — fragmenty jeszcze nie zdegradowanych błon. Obumarłe komórki tkanki bakteroidalnej mogą być zasiedlane przez pałeczkowate rizobia, prawdopodobnie dostające się do nich z nici infekcyjnych już po zaniku protoplastu. Po rozpadzie brodawki, bakterie te powracają do środowiska glebowego.



Rys. 4. Fragment dojrzałej tkanki bakteroidalnej. Skróty: S — symbiosom, b — bakteroid, SK — ściana komórkowa, M — mitochondrium, A — amyloplast, ER — endoplazmatyczne retikulum, AG — aparata Golgiego.

Pomimo stopniowego zamierania najstarszych komórek tkanki bakteroidalnej, brodawka jako całość może funkcjonować długi, liczony w miesiącach (przypuszczalnie i w latach w przypadku wieloletnich roślin drzewiastych), czas dzięki działalności merystemu brodawki. Brodawki korzeniowe, w których długo utrzymuje się aktywność merystematyczna, określa się terminem „brodawki niezdeterminowane” (NEWCOMB 1981). Termin ten jest niezbyt szczęśliwym tłumaczeniem angielskiego „indeterminate nodules” i w istocie odnosi się do merystemu wzrostu nieograniczonego, istniejącego i funkcjonującego w tych brodawkach. Brodawki niezdeterminowane są jednym z dwu istniejących typów brodawek korzeniowych, wytwarzane przez bardzo liczne gatunki roślin motylkowatych (najpospolitsze z nich: koniczyna, lucerna, seradela, groch). Drugim, równie częstym typem brodawek korzeniowych, są brodawki zdeterminowane, których aktywność merystematyczna zanika całkowicie po określonym czasie —

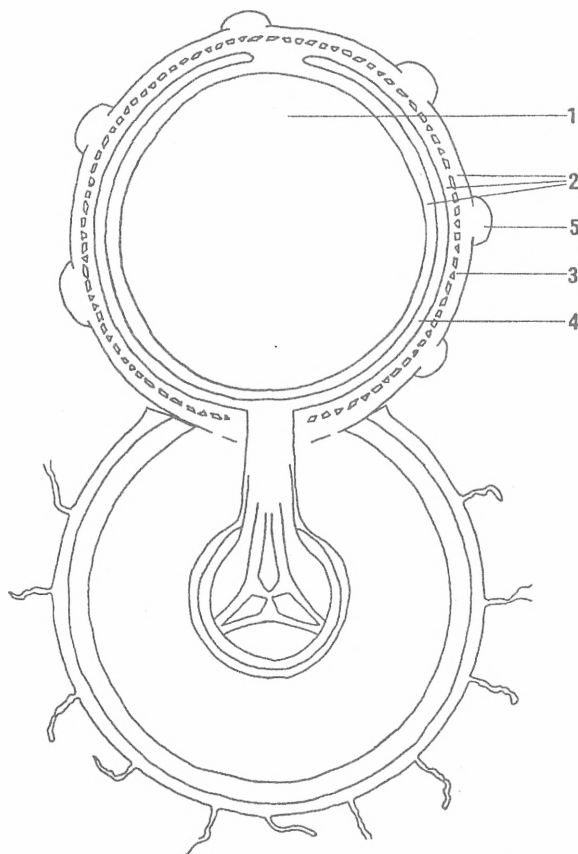
są więc one wytwarzane przez merystem wzrostu ograniczonego. Takie brodawki rozwijają się na korzeniach roślin pochodzących głównie z gorącej strefy klimatycznej, między innymi przez fasolę, soję, komonice. Co ciekawe, brodawki powstające pod wpływem tego samego szczepu bakterii na różnych gatunkach roślin mogą należeć do odmiennych typów — na przykład *Rhizobium loti*, którego gospodarzem jest komonica, ale które może infekować także seradłę, powoduje powstawanie na komonicy brodawek zdeterminowanych, na seradeli zaś — niezdeterminowanych (HIRSCH 1992). Zjawisko to jest zrozumiałe, zważywszy, że program morfogenezy brodawki jest kodowany przez roślinę, a bakteria ma tylko ten program uruchomić. Raz uruchomiony, jest przez roślinę realizowany, jednak pod warunkiem jego opłacalności energetycznej, to jest utrzymującego się niedoboru azotu mineralnego w podłożu, odpowiedniej intensywności fotosyntezy rośliny — ale także pod warunkiem, że szczep bakterii, który zasiedlił brodawkę, jest zdolny do unikania rozpoznania przez system obronny rośliny i do wydajnego wiązania azotu. Istnieją uzasadnione przypuszczenia, że także w dalszych etapach symbiozy, już po zasiedleniu nici infekcyjnej we włóśniku, zachodzi wymiana sygnałów pomiędzy symbiontami — swoiste wzajemne „sprawdzanie się” co do dalszej przydatności w rozwijającym się układzie (patrz artykuł A. Skorupskiej i J. Króla w tym zeszycie).



Rys. 5. Degradacja tkanki bakteroidalnej. Skróty: FS — fuzja symbiosomów, M — mitochondrium, A — amyloplast, ER — endoplazmatyczne retikulum, MD — „membrany-~duchy”.

W literaturze dotyczącej brodawek korzeniowych funkcjonują także inne od przytoczonego systemu ich klasyfikacji. Opierają się one na cechach morfologicznych lub kombinacji cech morfologicznych i dotyczących rozwoju brodawek, stąd też są mniej jednoznaczne i nie będą tu omawiane (CORBY 1981).

Etapy powstawania i rozwoju brodawek zdeterminowanych (rys. 6) są podobne, jak w przypadku brodawek niezeterminowanych. Tutaj także morfogeneza brodawki rozpoczyna się od rozpoznania symbiontów, kolonizacji młodych włośników i ich skręcania się w odpowiedzi na osiedlenie się rizobiów na ich powierzchni (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Inna jest jednak lokalizacja komórek kompetentnych do odpowiedzi na sygnał indukujący rozwój brodawki — są to komórki kory pierwotnej korzenia leżące bezpośrednio pod infekowanym włośnikiem. Zatem odróżnicowanie komórek kory przebiega tu w kierunku odwrotnym — dośrodkowo, w kierunku najbliższego pasma drewna pierwotnego. Zawiązek brodawki jest penetrowany przez nić infekcyjną, wrasta ona do kilku komórek i są z niej uwalniane bakterie. Zainfekowane komórki nie tracą jednak jeszcze zdolności dzielenia się, a symbiosomy podczas mitozy są segregowane pomiędzy komórki potomne w ten sam sposób, co organelle gospodarza. Po podziale komórki liczba symbiosomów rośnie wskutek ich podziałów. W pełni wykształcona brodawka zdeterminowana nie zawiera komórek dzielących się — wszystkie komórki merystematycznego zawiązka brodawki różnicują się w ko-



Rys. 6. Budowa brodawki korzeniowej typu zdeterminowanego: 1 — tkanka bakteroidalna, 2 — miękisz kory brodawki, 3 — komórki zawierające kryształki szczawianu wapnia, 4 — wiązka przewodząca, 5 — przetchninka; budowa korzenia — patrz rysunek 2.

mórki tkanek stałych. W centralnej części jest zlokalizowana jednorodna wiekowo tkanka bakteroidalna, zawierająca nieliczne komórki niezainfekowane (rys. 6). Komórki te uczestniczą w dalszych etapach przekształcania produktów wiązania azotu cząsteczkowego w związki eksportowane tkanką przewodzącą z brodawki. Tkanka bakteroidalna jest otoczona parenchymatyczną korą, której wewnętrzne komórki są małe i ściśle ułożone, w warstwach zewnętrznych — większe i z przestrzeniami międzykomórkowymi. Kora nie zawiera warstwy zdrewniałych komórek, występuje w niej natomiast nieregularna warstwa komórek z kryształami szczawianu wapnia (SUTHERLAND i SPRENT 1984). Na powierzchni kory są wytworzone obszary luźnej parenchymy — przetchlinki. Wiązki przewodzące są zbudowane podobnie jak w brodawkach niezdeterminowanych, jednak ich perycykl nie wykształca komórek transferowych. Oprócz różnic o charakterze morfologicznym, pomiędzy brodawkami niezdeterminowanymi i zdeterminowanymi występują istotne różnice w szlaku wiązania azotu, czego konsekwencją jest eksportowanie przez te brodawki odmiennych związków azotu do pozostałej części rośliny — w przypadku brodawek niezdeterminowanych są to amidy, zdeterminowanych — ureidy.

FORMATION AND DEVELOPMENT OF LEGUME ROOT NODULES

Summary

The paper summarizes briefly the processes of root hair infection, root nodule primordium formation, infection thread penetration and bacteria release, as well as formation of symbiosomes. The anatomical structure of indeterminate and determinate root nodule types is described.

LITERATURA

- BREWEN N. J., PEROTTO S., KANNENBERG E. L., RAE A. L., RATHBUN E. A., LUCAS M. M., KARDAILSKY I., GUNDER A., BOLANOS L., DONOVAN N., DROBAK B. K., 1993. *Mechanisms of cell and tissue invasion by Rhizobium leguminosarum: the role of cell surface interactions*. [W:] E. W. NESTER i D. P. S. VERMA, (red.), Kluwer Academic Publishers, *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction* 369-380.
- BRUSSEL van A. A. N., BAKHUIZEN R., SPRONSEN van 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.
- CORBY H. D. L., 1981. *The systematic value of leguminous root nodule*. [W:] R. M. POLHILL i P. H. RAVEN (red.), *Advances in Legume Systematics* 657-669.
- GOLINOWSKI W., KOPCIŃSKA J., BORUCKI W., 1987. *The morphogenesis of lupine root nodules during infection by Rhizobium lupini*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 56, 687-703.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. *New Phytol.* 122, 211-237.
- MITCHELL J. P., 1965. *The DNA content of nuclei in pea root nodules*. *Ann. Bot.* 29, 371-377.
- NAGL W., 1978. *Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution*. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- NEWCOMB W., 1981. *Nodule morphogenesis and differentiation*. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13. *Biology of the Rhizobiaceae* 13, 247-297.
- SUTHERLAND J. M., SPRENT J. I., 1984. *Calcium-oxalate crystals and crystal cells in determinate root nodules of legumes*. *Planta* 161, 193-200.