

Współzawodnictwo pomiędzy szczepami bakterii brodawkujących rośliny motylkowe

Barbara Golińska

Cezary J. Mądrzak

Katedra Biochemii i Biotechnologii
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego
Poznań

1. Wprowadzenie

Fundamentalna rola mikroorganizmów glebowych w zapewnieniu równowagi troficznej w biosferze jest faktem znanym, lecz jednocześnie nie w pełni docenianym. Wśród wielu procesów warunkujących obieg pierwiastków biogennych szczególne miejsce zajmuje cykl azotowy. Paradoksalnie, będąc jednym z tzw. makroelementów w organizmach żywych, pierwiastek ten jest stosunkowo rzadki stanowiąc zaledwie ok. 0,0014% masy skorupy ziemskiej. Z tego tylko 2% jest zlokalizowane w biosferze. Co więcej, dystrybucja tej niewielkiej, w porównaniu z masą skorupy ziemskiej, ilości azotu w biosferze, czyni go trudno dostępnym dla roślin. Oto bowiem tylko około 0,04% jego ilości występuje w postaci potencjalnie przyswajalnej — w glebie, w osadach dennych i w samych organizmach żywych. Około 99,96% azotu występującego w biosferze, to azot cząsteczkowy (N_2) będący składnikiem atmosfery ziemskiej.

Ta prezentacja danych, w istocie encyklopedycznych, pozwala z całym przekonaniem postawić tezę, że jednym z podstawowych procesów dla istnienia życia na Ziemi jest biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego. Proces ten nazywany również diazotrofią, polegający na enzymatycznej redukcji azotu cząsteczkowego do postaci jonu amonowego, jest w biosferze realizowany wyłącznie przez niektóre organizmy prokariotyczne, te mianowicie, które posiadają geny kodujące enzym nitrogenazę.

Dane liczbowe określające skalę zjawiska są raczej szacunkowe, jednak wśród większości autorów panuje zgodność co do tego, że współcześnie diazotrofia dostarcza około 60% występującego na Ziemi azotu związanego w formie zredukowanej (po uwzględnieniu przemysłowej produkcji nawozów azotowych), co stanowi nie mniej niż $17,2 \times 10^7$ ton rocznie (1,2). Wprowadzenie czynnika czasu, a zatem kalkulacja wiązania azotu w skali roku, jest szczególnie ważne, gdyż w przyrodzie funkcjonuje proces zwracania azotu do at-

mosfery, a zatem, w istocie przeciwny w stosunku do diazotrofii, na który składają się nityfikacja i denityfikacja.

Wśród biologicznych systemów zdolnych do diazotrofii najważniejsze miejsce zajmuje symbiotyczny układ tworzony przez rośliny motylkowate i glebowe bakterie zaliczane do rodziny *Rhizobiaceae*. Efektem funkcjonowania symbiozy motylkowatych jest wiązanie około 90 mln ton azotu rocznie w skali biosfery. Zastąpienie azotu niezbędnego do produkcji nasion roślin motylkowatych (źródło 25-35% białka spożywanego przez mieszkańców Ziemi) przez nawozy azotowe wymagałoby zużycia około 288 mln ton paliw kopalnych, co można przeliczyć na około 30 mld USD rocznie (1996) (3).

Dlatego zatem, we wstępie do artykułu pojawiła się uwaga, że diazotrofia jest zjawiskiem nie w pełni docenianym? Po pierwsze, wydajność procesu diazotrofii jest zmienna i zależy od wielu czynników środowiskowych, a zatem w intensywnej uprawie roślin motylkowatych zastosowanie mineralnego nawożenia azotowego wielu rolnikom wydaje się racjonalne. Trzeba zresztą przyznać, że w przeciwieństwie do dziko rosnących roślin motylkowatych, odmiany uprawne były selekcjonowane pod kątem podwyższonej wydajności bądź świeżej masy, bądź też masy nasion. Z tego wynika w oczywisty sposób zwiększone, w porównaniu z formami wyjściowymi, zapotrzebowanie na składniki mineralne. Po drugie, nawet, jeżeli rolnik uprawiający rośliny motylkowate zdaje sobie w pełni sprawę z ich zdolności do symbiotycznej diazotrofii, jest często bezradny wobec niskiej wydajności tego procesu, czy też całkowitego braku brodawek korzeniowych. Nawet przy zastosowaniu dostępnych w handlu kultur bakteryjnych (inokulów), uzyskiwane efekty są często niezadowalające. W efekcie, powstaje sytuacja, w której obiektywne właściwości roślin i mikroorganizmów glebowych przestają być brane pod uwagę. Znaczenie inokulacji nasion kulturami bakterii brodawkujących jest, jak się wydaje, bardziej doceniane w krajach trzeciego świata, niż na obszarach dobrze rozwiniętego i wydajnego rolnictwa (4).

Rozwój mikrobiologii, a szczególnie postęp w zakresie metod pomiarowych i diagnostycznych wykazał istnienie wielkiego zróżnicowania populacji szczepów bakterii brodawkujących w zakresie ich zdolności do indukowania rozwoju brodawek korzeniowych, a także co jeszcze ważniejsze — zróżnicowanej efektywności diazotrofii.

Diazotrofia, ze względu na koszt energetyczny funkcjonowania nitrogenazy, jest procesem przebiegającym zasadniczo wyłącznie w warunkach głodu azotowego. Spośród licznych grup mikroorganizmów diazotroficznych tylko bardzo nieliczne są zdolne do eksportu zredukowanego azotu poza swoją komórkę. Do tych diazotrofów można zaliczyć symbiotyczne *Rhizobiaceae*. Pewnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest z całą pewnością zdolność asymilacji jonu amonowego przez komórkę gospodarza roślinnego, a zatem permanentne obniżanie stężenia tego jonu w bezpośrednim otoczeniu mikro-symbionta. Jednakże, jeżeli rozważamy możliwość zwiększenia wydajności diazotrofii, musimy zdać sobie sprawę, że działania takie muszą przebiegać na granicy wydajności naturalnych mechanizmów metabolicznych.

Możliwość ulepszania szczepów bakteryjnych w celu ich zastosowania, jako inokula w uprawie roślin motylkowatych jest jednym z celów, którego

osiągnięcie może w istotny sposób poprawić „zrównoważenie” rolnictwa (3,5-7), co wydaje się godne poparcia.

Z pozoru problem nie wydaje się specjalnie złożony. W ciągu ostatnich 50. lat wyizolowano i zidentyfikowano ogromną liczbę szczepów *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*, które są bardzo wydajne pod względem wiązania N_2 . Również techniki manipulacji genetycznych pozwalają na otrzymanie jeszcze bardziej efektywnych szczepów *Rhizobium*, które mogą być wykorzystywane w produkcji inokulum. Współczesna wiedza na temat symbiozy *Rhizobium* — rośliny motylkowate pozwala na spełnienie pierwszego warunku dla uzyskania dobrego inokulum, a mianowicie otrzymania wysokoefektywnych w wiązaniu azotu szczepów *Rhizobium*. Wydajną diazotrofię daje się niestety w większości przypadków obserwować wyłącznie w doświadczalnych warunkach gnotobiotycznych. Istotną barierą dla wprowadzania wydajnych szczepów do gleby pozostaje sprawa przeżywalności tych szczepów w glebie i ich konkurencyjności we współzawodnictwie o nisze w obrębie brodawek korzeniowych roślin motylkowatych.

2. Zasiedlenie komórek rośliny gospodarza jest wynikiem zwycięstwa jednego z współzawodniczących szczepów

Obiektem naszego zainteresowania jest analiza systemu, którego elementami są roślina, oraz dwa lub więcej różnych szczepów zdolnych do jej infekcji, a zatem specyficznych w stosunku do gatunku i genotypu gospodarza. Nie poruszamy zagadnień z zakresu specyficzności oddziaływań rośliny motylkowate — *Rhizobiaceae*.

Wysoką wydajność inokulacji, czyli indukcję dużej liczby brodawek przez szczep bakteryjny wprowadzony do gleby w postaci inokulum obserwowano wielokrotnie podczas doświadczeń, w których rośliny motylkowate były hodowane po raz pierwszy w glebach pozbawionych rdzennych rizobiów* (8-12). Większość gleb wykorzystywanych w rolnictwie zawiera jednak populacje rizobiów, które agresywnie konkurują w procesie brodawkowania gospodarza roślinnego ze szczepami wprowadzonymi w procesie inokulacji. W literaturze opisano szereg obserwacji fenomenu konkurencyjności szczepów. W wielu przypadkach, już w tym samym roku, w którym przeprowadzano inokulacje

* Dalsze stosowanie nazwy *Rhizobium* dla oznaczenia ogółu bakterii glebowych zdolnych do brodawkowania roślin motylkowych nie jest już uprawnione. Wyróżniono nowe rodzaje mikroorganizmów zdolnych do symbiotycznej diazotrofii. Nazwą zastosowaną dla ogólnego określenia tych bakterii mogłaby być nomenklatura Rodziny: *Rhizobiaceae*, lecz obejmuje ona również mikroorganizmy patogeniczne (Rodzaj *Agrobacterium*). Godny poparcia, jak się wydaje, jest pomysł wprowadzenia spolszczonej nazwy: rizobia (np. szczepy rizobiów), oznaczającej wszystkie klasyfikowane w obrębie *Rhizobiaceae* Rodzaje diazotroficznych bakterii symbiotycznych. W przedstawianej pracy przyjęto taką konwencję rezerwując nieodmienną nazwę *Rhizobium* dla bakterii jednoznacznie zaliczanych do tego Rodzaju.

obserwowano bardzo niski poziom wprowadzonych bakterii w glebie (13-17). Niekiedy większość brodawek zebrana w pierwszym sezonie po inokulacji była zasiedlona przez wprowadzone do gleby bakterie, ale niestety w następnych latach były one stopniowo zastępowane przez rdzenne rizobia (9,18-22). Problem polega oczywiście na tym, że wprowadzane do gleby w postaci inokulum mikroorganizmy były wyselekcjonowanymi, wysoce efektywnymi w procesie wiązania azotu atmosferycznego szczepami, górującymi pod tym względem nad rizobiami endogennymi. W tej sytuacji założony jako rezultat sztucznej inokulacji wzrost plonów roślin motylkowatych po prostu nie zachodził.

Proces powstawania systemu symbiotycznego jest skomplikowany i wieloetapowy. Nawet po spełnieniu wszelkich warunków umożliwiających rozpoznanie partnerów i wzajemne dostosowanie — modulację ekspresji specyficznych zestawów ich genów (23,24), sukces w tworzeniu funkcjonalnej brodawki korzeniowej nie jest wcale oczywisty. Zależy on w dużej mierze od warunków środowiska w jakich przyszło funkcjonować makrosymbiontowi — roślinie i mikrosymbiontowi — bakterii.

Proces brodawkowania w warunkach polowych zależy jest od wielu czynników środowiskowych, takich jak: rodzaj gleby, jej pH, obecności jonów glinu, magnezu oraz azotanowych (V), jak również wapnia i związków fosforu. Również temperatura i wilgotność gleby ma ogromny wpływ na omawiany proces. Szczepy wprowadzane do gleby w postaci inokulum muszą ponadto konkurować o substancje pokarmowe z mikroorganizmami zasiedlającymi ryzosferę, dobrze zaadaptowanymi do warunków środowiska.

Rozwiązanie problemu trwałego wprowadzenia efektywnych szczepów rizobiów w postaci inokulum do ekosystemu zawierającego endogenną populację tych mikroorganizmów zależy od lepszego poznania wielu czynników biotycznych i abiotycznych wpływających na dynamikę populacji bakterii glebowych. Nie potrafimy jednoznacznie określić roli rośliny gospodarza w wyborze mikrosymbionta. Pomimo iż zebrano wiele informacji na temat roli czynników środowiskowych, ich pełna interpretacja jest w dalszym ciągu niemożliwa. Pomimo niewątpliwych postępów na tym polu, trudne jest również określenie podstaw genetycznych konkurencyjności bakterii w procesie brodawkowania.

3. Czynniki środowiskowe wpływające na współzawodnictwo bakterii biorących udział w procesie tworzenia brodawek korzeniowych

3.1. Właściwości i rodzaj gleby — czynniki edaficzne

Gleba jest środowiskiem i źródłem substancji pokarmowych dla bakterii brodawkujących w saprofitycznej fazie ich życia, dlatego też czynniki edafi-

czne mają ogromny wpływ na przeżywalność i wzajemną konkurencyjność populacji zarówno mikroorganizmów endogennych, jak też szczepów wprowadzonych do gleby jako inokulum.

Ogólnie, gleby o odczynie obojętnym lub słabo alkalicznym sprzyjają brodawkowaniu roślin motylkowatych, natomiast środowisko kwaśne uniemożliwia większości gatunków tych roślin zainicjowanie stanu symbiozy. W glebach kwaśnych znacznie obniża się wydzielanie przez roślinny system korzeniowy związków węgla, które są substratami dla mikroorganizmów żyjących w ich ryzosferze. Niskie pH gleby prowadzi jednocześnie do wzrostu dostępności związków glinu i magnezu, które w wysokich stężeniach stają się toksyczne, jak również do obniżenia zawartości związków fosforu, wapnia i molibdenu (25). Zaobserwowano, że rizobia szybko rosnące są mniej tolerancyjne na wysokie stężenia glinu niż szczepy wolno rosnące. Udało się wyizolować szczepy o wysokiej tolerancji na niskie pH i wysokie stężenia glinu. Zastosowano je z dużym powodzeniem jako inokulum w zachodniej Australii w uprawach lucerny (26,27).

Odczyn gleby może być, jak się zdaje, czynnikiem selekcyjnym w obrębie populacji szczepów potencjalnie zdolnych do brodawkowania tego samego gatunku rośliny gospodarza. W badaniach nad brodawkowaniem fasoli stwierdzono, że między innymi pH gleby decyduje o tym, która grupa szczepów („symbiotyp”) *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* będzie bardziej konkurencyjna w procesie zasiedlania komórek *P. vulgaris* (28). Środowisko glebowe posiada wiele specyficznych cech, które trudne są do otworzenia w warunkach laboratoryjnych. Jednak pH gleby łatwo jest regulować *in vitro*, co daje możliwość łatwego selekcjonowania szczepów. W doświadczeniach laboratoryjnych z *Rhizobium trifolii* i *Rhizobium meliloti* stwierdzono dobry wzrost niektórych szczepów przy niskim pH. Nie oznacza to niestety, że tak samo będą się one zachowywać w glebie o podobnym pH (27). Proces brodawkowania podlega bowiem, z całą pewnością, wpływowi również innych czynników, takich jak: zasolenie, obecność azotanów, niskie stężenie jonów wapnia lub związków fosforowych (29,30), a także obecność pestycydów. Niski poziom azotu mineralnego w glebie, dla przykładu, ma zdecydowanie korzystny wpływ na konkurencyjność szczepów wprowadzanych w warunkach polowych w postaci inokulum (31).

Na przeżywalność bakterii brodawkujących, a co za tym idzie, na zjawiska współzawodnictwa o możliwość zasiedlenia komórek rośliny gospodarza, mają wpływ również takie czynniki, jak stosunki powietrzno-wodne w glebie i temperatura. Stres wodny ma istotny wpływ na możliwość infekcji komórek korzenia rośliny przez mikroorganizmy symbiotyczne. Zarówno niedostatek, jak i nadmiar wody w glebie niekorzystnie wpływają zarówno na proces brodawkowania, jak i diazotrofii (32). W kontekście naszych rozważań nad konkurencyjnością szczepów *Rhizobium*, czynnik ten jest bardzo trudny do interpretacji, gdyż wpływa na inne parametry środowiska glebowego. Na przykład podwyższona wilgotność gleby stymuluje procesy beztlenowe, które z jednej strony prowadzą do pojawienia się w glebie fitotoksyn (produktów mikroorganizmów beztlenowych), z drugiej zaś, do podwyższonej syntezy etylenu

przez roślinę. Żaden z tych czynników nie jest obojętny dla populacji rizo-biów. W niektórych przypadkach, jak się wydaje, jest celowe poszukiwanie szczepów *Rhizobiaceae* odpornych na suszę, a także, bardziej ogólnie, bada-nie systemów symbiotycznych w aspekcie ich produktywności w warunkach niedoboru wody w glebie (33-36). Problem niezrównoważonych stosunków powietrzno-wodnych w glebie pojawia się regularnie w niektórych regionach uprawy roślin motylkowatych (w tym również w naszej strefie klimatycznej) i musi być brany pod uwagę w pracach nad zwiększaniem wydajności dia-zotrofii symbiotycznej.

Dla przebiegu procesu symbiozy istotna jest (poza czynnikami edaficznymi), również temperatura, w której tworzy się i funkcjonuje symbiotyczny system motylkowate — *Rhizobiaceae*. Proces brodawkowania badano w szerokim zakresie temperatur. Stwierdzono, że dla większości diazotroficznych systemów symbiotycznych optymalna temperatura to 15 – 30°C (32,37-40). U roślin motylkowatych klimatu umiarkowanego podwyższenie temperatury wpływa na inicjację i rozwój brodawek, natomiast u roślin klimatu tropikalnego na wydajność symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego. Niskie temperatury obniżają proces brodawkowania i wiązania azotu u roślin klimatu umiarkowanego, jakkolwiek tworzenie brodawek korzeniowych obserwuje się również w tak skrajnych warunkach, jak ekosystemy tundry kanadyjskiej (41,42). Temperatura nie pozostaje bez wpływu również na konkurencyjność szczepów *Rhizobium*. Stwierdzono, że pewne kombinacje szczepu mikrosymbionta i genotypu rośliny gospodarza inicjują interakcje symbiotyczne w ściśle określonych przedziałach temperatury. Dla przykładu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* szczep TA1 indukuje rozwój brodawek na *Trifolium subterraneum* odm. Woogenellup w warunkach laboratoryjnych, w temperaturze powyżej 25°C, lecz nie niższej niż 22°C, natomiast inne odmiany rośliny gospodarza ulegały brodawkowaniu, przez ten sam szczep bakteryjny, w niższych temperaturach. W warunkach polowych szczep TA1 nie był efektywny w procesie infekcji i tworzenia brodawek na *Trifolium subterraneum* (43-45).

Selekcja wydajnych diazotrofów, jako szczepów przeznaczonych do produkcji inokulów może polegać na wyszukiwaniu kombinacji cech dających tym szczepom przewagę w danych warunkach środowiska. Równie ważny jak plonowanie roślin jest inny aspekt wykorzystania procesu diazotrofii: Liczne gatunki roślin motylkowatych mogą być z powodzeniem stosowane dla rekultywacji gleb zdegradowanych, a często również skażonych, jako składniki odtwarzanego systemu ekologicznego (3). Wykorzystanie selekcyjnego wpływu skrajnych czynników edaficznych jest jednak trudniejsze do zastosowania w stosunku do szczepów przeznaczonych dla roślin uprawnych. Gleby o niekorzystnych dla plonowania roślin parametrach nie są bowiem z reguły traktowane jako użytki rolnicze.

3.2. Liczebność endogennej populacji *Rhizobium* w glebie

Niezależnie od istotnej roli czynników edaficznych, na odniesienie sukcesu lub przegraną szczepów wprowadzonych do gleby w postaci inokulum, wpły-

wają również rozliczne czynniki biotyczne. Do najważniejszych należy liczebność rdzennych populacji rizobiów. Liczebność tych populacji w glebie jest bardzo zmienna, może wynosić od < 10 do 10^7 komórek na gram gleby. Jest ona ściśle zależna od omawianych wcześniej czynników edaficznych, a także od innych czynników biotycznych (46-48). Szczególnie obecność w glebie korzeni rośliny gospodarza ma ogromny wpływ na wielkość populacji *Rhizobium* będących jej mikrosymbiontami. Zwykle liczebność bakterii określonego szczepu rizobiów jest znacznie większa w glebach, gdzie roślina gospodarza była lub jest uprawiana obecnie (49-52). Nawet relatywnie niewielka liczebnie populacja rizobiów w glebie może stwarzać wielką barierę dla szczepów wprowadzonych w postaci inokulum. W serii doświadczeń przeprowadzonych przez Thies i wsp. (53) polegających na inokulacji siedmiu gatunków roślin motylkowatych pokazano, że pokonanie współzawodnictwa szczepów endogennych przez szczepy wprowadzane (co związane jest ze zwiększeniem plonowania) była zdecydowanie zależna od liczebności populacji bakterii endogennych. Nawet tak mała liczba, jak 50 komórek rizobiów na gram gleby eliminowała wzrost plonów związany z procesem inokulacji, podczas gdy przy braku rdzennych populacji rizobiów wzrost plonów roślin motylkowatych wynikający z zastosowania inokulacji był wprost proporcjonalny do dostępności mineralnego azotu. Dla endogennych szczepów *Bradyrhizobium japonicum* liczba 50 - 100 komórek na gram gleby wystarcza dla efektywnego brodawkowania przez nie soi (53,54) i całkowicie eliminuje wpływ bakterii wprowadzonych do gleby w postaci inokulum.

Jaka jest zatem wielkość populacji bakterii endogennych, która pozwala na efektywne wprowadzenie bakterii brodawkujących do gleby? Niestety nie ma jednoznacznej odpowiedzi. Wykazano, że im liczba rizobiów jest mniejsza, tym szansa na wygranę współzawodnictwa w zakresie nodulacji dla szczepów wprowadzonych do gleby jest większa (50,55-58). Stwierdzono również, że po wprowadzeniu do uprawy rośliny gospodarza, niezależnie od przeprowadzonej inokulacji, w drugim roku uprawy rizobia endogenne zasiedlały już większość brodawek, nawet wtedy gdy ich populacja była początkowo bardzo nieliczna i wynosiła 10 komórek na gram gleby (57).

3.3. Inne czynniki biotyczne

Jakkolwiek obecność rdzennych rizobiów jest podstawowym czynnikiem biotycznym będącym pierwotną przyczyną pojawienia się zagadnienia konkurencyjności bakterii brodawkujących jako takiego, to jednak warto pamiętać, że nie jest to czynnik jedyny. Gleba, a szczególnie interesujący nas obszar ryzosfery, jest środowiskiem życia dla wielkiej liczby i różnorodności organizmów. Szacuje się, że liczba samych tylko mikroorganizmów może w ryzosferze osiągnąć wartość 10^{12} komórek na gram gleby (59,60). W wolnej glebie liczba ta jest 10 - 1000 razy niższa.

Coraz większego znaczenia nabiera zagadnienie jaki wpływ wywierają na wzrost i rozwój roślin różne populacje mikroorganizmów glebowych. Oddziaływania rośliny-mikroorganizmy mogą mieć różny charakter. Co ciekawe,

oprócz istnienia mikroorganizmów wpływających niekorzystnie na roślinę, lub takich, których wpływ pozostaje niezauważalny, wyróżnia się także grupę gatunków mikroorganizmów wywierających korzystny wpływ na rozwój roślin (59,61-64). W kontekście naszych rozważań szczególnie ważne jest to, że korzystnemu wpływowi tych mikroorganizmów zaliczanych do grupy PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) podlegają również rozwijające się systemy symbiotyczne (65-68). W dobrze udokumentowanym przypadku udało się wykazać, że PGPR (izolaty *Bacillus* sp. i *Enterobacter* sp.) mogą bezpośrednio wpływać na konkurencyjność wprowadzonych jako inokulum szczepów *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*). Podobne rezultaty uzyskano badając wpływ *Bacillus cereus* (69), lub *Pseudomonas* sp. (70) na brodawkowanie soi. Jednocześnie, obecność w glebie bakterii epifitycznych *Erwinia herbicola* może obniżać proces brodawkowania przez produkcję toksyn, które blokują wiązanie rizobiów do włóśników korzeniowych (71).

Na efekty wprowadzania szczepów rizobiów do gleby mogą wpływać również takie czynniki jak obecność bakteriofagów, oraz szczepów zdolnych do syntezy antybiotyków (bakteriocyn) (72-75). Znaczenie bakteriocyn polega, jak się sądzi, na regulowaniu dynamiki populacji bakteryjnych w obrębie gatunku (76). Najlepiej poznaną i scharakteryzowaną bakteriocyną *Rhizobiaceae* jest trifolitoksyna (TFX), mały peptyd syntetyzowany przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* szczep T24 (77,78). Trifolitoksyna hamuje wzrost wszystkich do tej pory badanych szczepów *Rhizobium* oraz α -proteobakterii i dlatego geny odpowiadające za syntezę TFX oraz odporność na nią były przenoszone do wielu szczepów *Rhizobium* w celu badania jej wpływu na ich konkurencyjność w glebie. Triplett (79) skonstruował szczep, w którym gen TFX wprowadzono do chromosomu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, zainfekował nim koniczynę i stwierdził, że szczep ten, produkując trifolitoksynę zasiedlał zdecydowanie więcej brodawek, niż szczep nie wytwarzający tego metabolitu. Ostatnio stwierdzono, że *Rhizobium etli* szczep CE3 wytwarzający trifolitoksynę wykazuje zdecydowanie większą konkurencyjność w kolonizacji ryzosfery i tworzenia brodawek korzeniowych na roślinach *Phaseolus vulgaris* niż bakterie nie produkujące TFX (80). Wciąż jednak nie jest jasne, czy synteza przez *Rhizobium* trifolitoksyny może być przydatna przy wprowadzaniu efektywnego szczepu bakteryjnego, jako inokulum w warunkach polowych.

Również organizmy eukariotyczne mogą mieć wpływ na stan populacji bakteryjnych, w tym na przeżywalność szczepów wprowadzonych do gleby. Ważnym czynnikiem biotycznym środowiska jest na przykład obecność pierwotniaków. Wpływa ona na znaczne obniżenie populacji *Rhizobium* stabilizując ich liczbę na niskim poziomie (81,82). Zastosowanie pestycydów, które niszczą omawiane organizmy (np. thiram) wpływa zdecydowanie korzystnie na wzrost kolonizacji *Phaseolus vulgaris* przez *Rhizobium phaseoli* (83).

Wpływ czynników środowiskowych na konkurencyjność szczepów *Rhizobium*, ich zdolności do brodawkowania roślin i wydajność procesu diazotrofii symbiotycznej, był obiektem zainteresowania autorów wielu prac przeglądowych (26,84-88). Niestety, ze względu na ogromne zróżnicowanie środowisk glebowych, w których funkcjonują systemy symbiotyczne, nie da się jak na

razie sformułować spójnej teorii opisującej w ujednoczony sposób zależności pomiędzy warunkami środowiska i skutecznością symbiotyczną wprowadzanych szczepów. Można się nawet obawiać, czy jest to w ogóle możliwe. Próby przygotowywania wydajnych inokulów powinny być raczej ukierunkowane na ich zróżnicowanie i przystosowanie do specyficznych wymagań zarówno gatunku rośliny gospodarza, jak i konkretnego regionu geograficznego, a nawet konkretnego stanowiska uprawowego.

4. Genetyczna regulacja zjawiska konkurencyjności szczepów *Rhizobiaceae* w procesie brodawkowania

Postępy, jakie poczyniła genetyka molekularna sprawiły, że możliwe stało się postawienie pytania: Czy istnieją geny (zarówno u roślin motylkowatych, jak i u *Rhizobiaceae*), których ekspresja decyduje o przewadze jednych szczepów nad innymi we współzawodnictwie o zasiedlenie rośliny gospodarza?

Zdobycie informacji na temat genów roślinnych jest znacznie trudniejsze niż w przypadku genów bakteryjnych. Jednakże, i na tym polu można odnotować istotny postęp. Punktem wyjścia dla dalszych rozważań musi stać się stwierdzenie, że genotyp rośliny gospodarza pełni aktywną rolę w wyborze mikrosymbionta. Warto przy tym pamiętać, że nie mamy tu na myśli „wyższego” poziomu specyficzności, który daje się opisywać, na poziomie gatunków rośliny gospodarza i mikrosymbionta. W tym przypadku mówiąc o wpływie genotypu rośliny na wybór mikrosymbionta, mamy na myśli poziom specyficzności bardzo „głęboki” — zjawisko zdolności brodawkowania określonych genotypów danego gatunku gospodarza, przez określone szczepy danego gatunku mikrosymbionta.

Najlepiej rozpoznany, pod tym względem, systemem symbiotycznym jest oddziaływanie soi (*Glycine max*) z *Bradyrhizobium japonicum*. Pojawiło się pojęcie genotypu restryktywnego soi. Jest to genotyp zdolny do selektywnego odrzucania niektórych szczepów *Bradyrhizobium japonicum* jako potencjalnych partnerów symbiozy. Takie genotypy zidentyfikowano na przykład jako linie soi nie podlegające brodawkowaniu przez liczne szczepy należące do serogrupy 123 (serotypy USDA 123, USDA 127 i USDA 129) (89). Co ciekawe, genotypy te są wydajnie brodawkowane przez inne szczepy *Bradyrhizobium japonicum*. Pierwsze roślinne geny odpowiedzialne za restrykcję brodawkowania soi odkryto już w połowie lat sześćdziesiątych (90-93) i opisano skrótem *Rj* (od *Rhizobium japonicum*). Na przykład, odmiana soi Hill posiada dominujący gen *Rj₄*, wywołujący zjawisko restrykcji brodawkowania — uniemożliwiający infekcję roślin tej odmiany przez niektóre szczepy *Bradyrhizobium japonicum* (USDA 61 oraz niektóre szczepy serogrupy 123). Również inne, dziedziczne zgodnie z prawami Mendla, geny odpowiedzialne są za restrykcję brodawkowania ich nosicieli przez niektóre szczepy *Bradyrhizobium japonicum*. Pojedynczy, dominujący gen *Rj₂* jest odpowiedzialny za niemożność brodawkowania jego nosiciela przez wszystkie znane szczepy se-

rogrupy 122 i c1 (90,91). Dominujący gen *Rj*₃ uniemożliwia brodawkowanie soi przez szczep USDA 33, choć inne, bliskie mu pod względem serologii szczepy mogą nosiciela tego genu infekować bez przeszkód (92). Genotypy soi homozygotyczne względem genu *rj*₅ lub *rj*₆ nie mogą być brodawkowane przez żadne ze znanych szczepów *Bradyrhizobium japonicum* (94). Geny te funkcjonują zatem w sposób zbliżony do wcześniej opisanego recesywnego genu *Rj*₁ (95,96). Warto zwrócić uwagę na fakt, że na przykład szczepy wydajnie brodawkujące genotypy soi *Rj*₂ i *Rj*₃ nie infekują genotypów *Rj*₄. Inne szczepy mogą wykazywać specyficzność dokładnie odwrotną. Zidentyfikowano również inny genotyp restryktywny soi PI 417566, który nie jest infekowany przez szczep *Bradyrhizobium japonicum* MN1 — 1c (USDA 430) oraz szczepy serogrupy 129 i USDA 110. Nieodparcie nasuwa się myśl, że geny *Rj* są swojego rodzaju analogami genów oporności roślin na patogeny (R), które funkcjonują w interakcjach typu „gen na gen” (*gene-for-gene interaction*). Odpowiednie geny mikrosymbionta bakteryjnego byłyby zatem analogami genów awirulencji (*avr*) patogena (86). Potwierdzeniem słuszności takiego porównania może być wyizolowanie mutantów *Bradyrhizobium japonicum* serogrupy 123, które powodują brodawkowanie genotypu restryktywnego PI 377578 oraz soi posiadającej allel *Rj*₄ (97). Uzyskano również mutanty szczepu USDA 110 brodawkujące genotyp PI 417566 restryktywny wobec bakterii typu dzikiego (98).

Funkcjonowanie genów odpowiedzialnych za restrykcję brodawkowania nie jest jeszcze poznane. Pojawiła się sugestia, że zablokowanie zdolności brodawkowania odmian restryktywnych soi przez niektóre szczepy *Bradyrhizobium japonicum* może być związane z organospecyficzną ekspresją genów roślinnych (w korzeniu), która ponadto podlega wpływowi temperatury. W badaniach mikroskopowych wskazuje się, że restryktywne genotypy soi hamują brodawkowanie tych szczepów *Bradyrhizobium japonicum* zarówno przed, jak i po utworzeniu zawiązków brodawek korzeniowych (primordiów) (99).

Oddziaływania typu „gen na gen”, jak się wydaje, mają również miejsce w symbiozie fasoli. Wyizolowano szczepy *Rhizobium tropici* i *Rhizobium etli*, które wykazują ograniczoną zdolność do brodawkowania genotypów typu dzikiego *Phaseolus vulgaris* (G21117 oraz G10002). Są one jednak efektywne w symbiozie z uprawnymi genotypami fasoli (Jamapa i Amarillo Gigante). Szczepy te okazały się jednocześnie wysoce konkurencyjne w stosunku do bardzo, skądinąd, wydajnego szczepu CIAT632, zasiedlającego często ponad 40% brodawek fasoli odmiany Jamapa (100).

Jednym z najlepszych przykładów genotypowej specyficzności brodawkowania jest symbioza prymitywnej odmiany grochu „Afghanistan” z *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Odmiana „Afghanistan” nie tworzy brodawek w wyniku infekcji szczepami brodawkującymi europejskie i północnoamerykańskie odmiany grochu (101,102). Wydajnym mikrosymbiontem tej odmiany grochu jest natomiast *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* szczep TOM. Obaj partnerzy tej efektywnej symbiozy występują na Środkowym Wschodzie (103). W przypadku omawianego systemu symbiotycznego o genotypowej specyficzności brodawkowania wiemy nieco więcej niż w innych przypadkach. Szczep

TOM posiada gen *nod X*, a odmiana grochu „Afghanistan” odpowiadający mu, prawdopodobnie recesywny gen *sym 2* (104,105). Szczep TOM syntetyzuje takie same czynniki Nod jak europejskie i północnoamerykańskie szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, z tą różnicą, że jeden z czynników Nod posiada grupę O-acetylową przy węglu C-6 na redukującym końcu oligo-N-acetylo-glukozaminy (106). Jakkolwiek przykład ten dobrze mieści się w hipotezie „gen na gen”, to jednak nie znamy molekularnego charakteru produktu(ów) ekspresji genu *sym 2* grochu.

Innym przykładem funkcjonowania oddziaływań typu „gen na gen” jest opisany przykład restrikcji brodawkowania *Trifolium subterraneum* odm. Woogenellup przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* szczep TA1 (107). Szczep ten zawiera dwa geny *nod M* i *csn-1*, które decydują o niemożności infekowania przezeń odmiany Woogenellup (44). Za taką specyficzność brodawkowania jest z drugiej strony odpowiedzialny pojedynczy recesywny gen roślinny *rut-1*. Co interesujące, wprowadzenie do szczepu TA1 genów *nod* z *Rhizobium leguminosarum* i *Rhizobium meliloti* pozwalały mu na brodawkowanie odmiany Woogenellup.

Dowodem na to, że genom *Rhizobium* decyduje o sukcesie w procesie brodawkowania gospodarza roślinnego może być stwierdzenie, że populacja genotypów *Rhizobium meliloti* izolowanych z gleby różni się znacznie od zestawu genotypów izolowanych z brodawek *Medicago sativa* i *Melilotus alba* (108). W niektórych przypadkach różnicę tę daje się powiązać z konkretną cechą: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* jest zdolny do brodawkowania grochu (*Pisum*), bobu (*Vicia*), soczewicy (*Lens*) i groszku (*Lathyrus*). Stwierdzono, że groch i bob preferują zdecydowanie odmienne szczepy *Rhizobium* występujące w naturalnej populacji, a współzawodnictwo o brodawkowanie grochu związane jest ze zdolnością danego szczepu do katabolizowania homoseryny (109). Fakt, że ostateczny wynik współzawodnictwa o możliwość kolonizacji komórek korzenia rośliny nie musi być związany wprost z przeżywalnością szczepu w saprofitycznej fazie jego życia — w glebie, może być potwierdzony również w przypadku soi. Dominacja szczepu USDA 123 pod względem zasiedlenia brodawek nie oznacza nieobecności konkurującego z nim szczepu USDA 110 w glebie. Ten ostatni występuje pospolicie jako saprofit glebowy stanowiąc nie mniej niż 30-40% komórek *Bradyrhizobium japonicum* zliczonych przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał znakowanych fluoresceiną (B. Golińska i C. Mądrzak, dane przygotowywane do publikacji).

Jeżeli chodzi o geny *Rhizobiaceae* decydujące o konkurencyjności szczepów, to udało się je, w niektórych przypadkach, zidentyfikować. Geny takie mogą regulować specyficzność, a co ważniejsze, również wydajność procesu brodawkowania zarówno negatywnie, jak i pozytywnie. Wskazuje się np. na udział genu *nol A* *Bradyrhizobium japonicum* w specyficzności brodawkowania określonych genotypów soi (110). Gen *nol A* *Bradyrhizobium japonicum* szczepu USDA 110 kodujący regulator transkrypcyjny (który wykazuje dużą homologię do *MeR*) był przenoszony w procesie koniugacji do szczepów *Bradyrhizobium japonicum* należących do serogrupy 123 umożliwiając im bro-

dawkowanie roślinnych genotypów restrykcyjnych, do czego nie były zdolne nie zmienione szczepy serogrupy 123. Sugeruje się, że gen *nol A* wykazuje efekt represyjny na indukowaną przez izoflawony ekspresję operonów *nod D* (1) i *nod YABC-SUIJ* (111). Podobnie gen *nol C* *Rhizobium fredii* zaangażowany jest w procesie rozszerzania specyficzności tego mikroorganizmu (112-114).

Bardzo obiecującym elementem procesu rozpoznania uczestniczących w symbiozie odmian, oraz rozwoju brodawki korzeniowej, jest rola egzopolisacharydów (EPS) i lipopolisacharydów (LPS) *Rhizobium* (115-119). Niestety, ciągle jeszcze brakuje teorii jednoznacznie wyjaśniającej udział tych składników struktur powierzchniowych rizobiów w ustaleniu zakresu gospodarza i konkurencyjności między szczepami. Problem jest tym bardziej interesujący, że EPS i LPS, jak się wydaje, mają różne znaczenie dla powstawania brodawek o ograniczonym i nieograniczonym wzroście (23,120). Nie jest wykluczone, że EPS i LPS przyczyniają się do sukcesu w procesie infekcji rośliny gospodarza poprzez supresję jego systemu obronnego, a także działając jako specyficzny sygnał stymulujący wzrost nici infekcyjnej (121-126). Oprócz syntezy polisacharydów strukturalnych, które należałoby rozpatrywać (w kontekście specyficzności i konkurencyjności szczepów) jako molekularne identyfikatory mikroorganizmów, również inne ich cechy są dobre do pełnienia istotnej funkcji w omawianych procesach. Należą do nich: zdolność do ruchu, synteza rizopin i bakteriocyn. Poznano również geny, których rola w konkurencyjności szczepów, jak się wydaje, jest pewna, jednak jak dotąd nie udało się jednoznacznie ustalić jaką rolę w metabolizmie mikroorganizmów geny te pełnią.

Zjawisko syntezy rizopin jest interesującym przykładem właściwości, która najprawdopodobniej nie jest uniwersalną cechą systemów symbiotycznych roślin motylkowatych z *Rhizobiaceae*. W niektórych populacjach *Rhizobium meliloti* (10%) i *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, (14% przebadanych szczepów) występuje zdolność do syntetyzowania specyficznych pochodnych inozytolu i związana z nią zdolność do ich katabolizmu. Znane związki zaliczane do tej grupy to *scyllo*-inozamina i L-3-O-metylo-*scyllo*-inozamina (127). Zarówno geny syntezy (*mos*) jak i geny katabolizmu rizopin (*moc*) zlokalizowane są na plazmidzie Sym. Co interesujące, geny *mos* ulegają ekspresji wyłącznie w bakteroidach posiadających je szczepów, zaś zsyntetyzowane rizopiny są wykorzystywane przez wolno żyjące formy tych rizobiów obecne w nici infekcyjnej lub ryzosferze (ekspresji ulegają tam geny *moc*). Tak jak należało się spodziewać, geny *mos* i *moc* podlegają odrębnym mechanizmom regulacyjnym. Te pierwsze, pozostają pod kontrolą systemu NifA/NtrA. W przypadku genów *moc* (w formach wolno żyjących *Rhizobium*) nie stwierdzono ani udziału regulatora symbiotycznego NifA, ani regulatorów NtrA i NtrC w regulacji ich ekspresji (128).

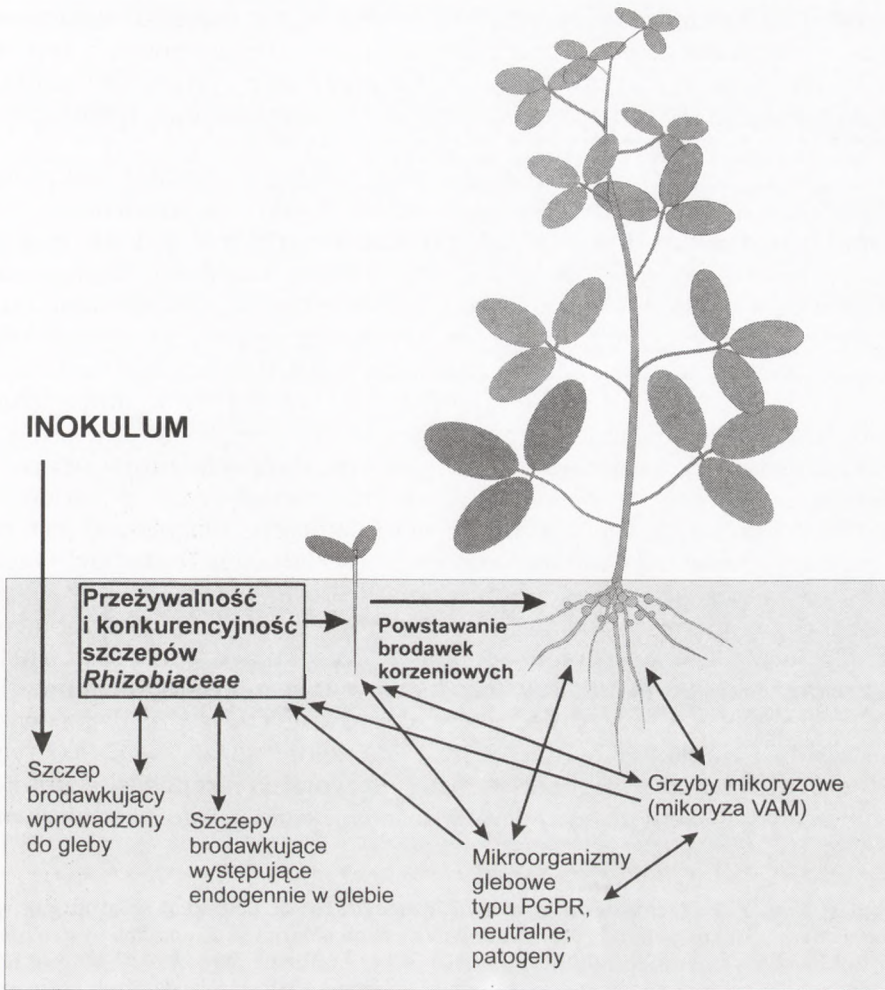
Stwierdzono, że rizopiny mogą wpływać na współzawodnictwo bakterii w procesie brodawkowania, ale mechanizm w jaki sposób ich synteza i katabolizm prowadzą do zwiększonego zasiedlenia brodawek przez szczep posiadający geny *mos* i *moc* nie jest jasny. Najprostsze wyjaśnienie sugerujące,

że rizopiny mogą wpływać na liczbę rizobiów dostarczając selektywnej substancji wzrostowej w ryzosferze, a także w nici infekcyjnej, nie jest wystarczające (129). W doświadczeniach prowadzonych przy użyciu mutantów *Rhizobium meliloti* sugeruje się, że rizopiny mogą mieć bezpośredni wpływ na proces infekcji, zapobiegając brodawkowaniu przez szczepy nie mogące ich katabolizować. Fenomen występowania rizopin, jakkolwiek ograniczony do niektórych tylko gatunków i szczepów mikrosymbionta otwiera możliwości manipulacji przy produkcji inokulów. Można by podwyższać konkurencyjność i trwałość w glebie korzystnych szczepów bakterii przez transfer genów odpowiedzialnych za syntezę rizopin do tych bakterii, względnie selekcję rizobiów produkujących interesujące rizopiny (128)

Interesujących danych dostarczyły badania nad wysoce konkurencyjnym i efektywnym w brodawkowaniu fasoli szczepem *Rhizobium etli* TAL 182. Udowodniono, że konkurencyjność szczepu może zaniknąć w wyniku mutacji w genie *slp* (130). Badany gen, obejmujący fragment DNA o długości 699 par zasad, koduje białko wykazujące 66-72% podobieństwa do stomatyny człowieka, myszy (*Mus musculus*) i nicienia *Caenorhabditis elegans*. Obecność genu *slp* stwierdzono w *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* i szczepach typu A *Rhizobium tropici* (lecz brak go w szczepach typu B). Gen *slp* nie występuje w szczepach *Bradyrhizobium* i w wielu innych przebadanych szczepach *Rhizobium*.

Innym przykładem genu wpływającego na konkurencyjność posiadającego go mikroorganizmu, jest gen *ros R* znaleziony w szczepie CE3 *Rhizobium etli* (131). Produkt ekspresji tego genu jest w 80% identyczny z białkiem Ros z *Agrobacterium tumefaciens* i białkiem MucR z *Rhizobium meliloti*, o których wiadomo, że są represorami transkrypcyjnymi zawierającymi palce cynkowe jako domeny wiążące DNA. Co ciekawe, udało się dowieść, że ten sam gen wpływa jednocześnie na trzy cechy: konkurencyjność we współzawodnictwie o zasiedlenie komórek korzenia rośliny gospodarza, konkurencyjność w ryzosferze, oraz na hydrofobowość powierzchni komórek swego nosiciela. Produkt genu *ros R* jako domniemany regulator transkrypcyjny jest, jak się wydaje, obiecujący do dalszych badań nad współzawodnictwem szczepów w procesie brodawkowania.

Również *Rhizobium meliloti* po raz kolejny zyskał status mikroorganizmu modelowego. W badaniach nad konkurencyjnością szczepów udowodniono, że za symbiotyczną sprawność swojego nosiciela odpowiada zlokalizowany na dużym plazmidzie (pRmeGR4b) szczepu GR4 region nazwany *nfe* (*nodule formation efficiency*) (132-135). Geny zlokalizowane w tym regionie wpływają na wydajność brodawkowania oraz konkurencyjność szczepów bakteryjnych, w których występują, nie są one jednak konieczne do zainicjowania symbiozy (133). W szczepach *Bradyrhizobium japonicum* także wykryto istnienie genu *nfe C* (136). Wzrost efektywności brodawkowania przez nosiciela genów *nfe* objawia się wcześniejszym zawiązywaniem się brodawek i większą ich liczbą przypadającą na roślinę (132). W konkurencji między szczepami obecność genów *nfe* powoduje wyższą częstość zasiedlania brodawek przez szczep nosiciela. Funkcja produktów poszczególnych genów *nfe* nie jest znana. Jedynie



Rys. 1. Czynniki wpływające na sprawność symbiotyczną szczepów *Rhizobiaceae* wprowadzanych do gleby w postaci inokulum.

Przedstawiony schemat interakcji obejmuje tylko główne czynniki biotyczne, których znaczenie, jak się wydaje, jest uniwersalne w symbiozie *Rhizobium* z roślinami motylkowatymi.

w przypadku białka NfeD dysponujemy danymi o homologii jego sekwencji aminokwasowej z cyklodeaminazą ornitynową z *Agrobacterium tumefaciens* (135). Poziom 26% homologii jest znaczący, trudno jednak wnioskować, czy Nfe D jest w istocie tym enzymem. Jednakże, włączenie szlaków katabolicznych, jako możliwego obiektu regulacji na poziomie konkurencyjności szczepów (lepszą zdolność do wykorzystywania zróżnicowanych źródeł łańcuchów węglowych), jest z całą pewnością możliwością atrakcyjną.

Rozwój technik badawczych dostarcza ciągle nowych, bardzo dogodnych narzędzi do badania dynamiki populacji mikroorganizmów glebowych i ich

interakcji z roślinami. Można mieć nadzieję, że na przykład zastosowanie techniki znakowania bakterii przy użyciu genów reporterowych (np. GUS) znacznie ułatwi, a co za tym idzie również przyspieszy prace nad konkurencyjnością szczepów *Rhizobiaceae* w procesie brodawkowania roślin motylkowatych (137,138).

Z przeglądu danych na temat zjawiska konkurencyjności mikroorganizmów wynika, że czynniki wpływające na symbiotyczną sprawność szczepu są liczne i różnorodne (rys. 1). Ich poznanie warto jest jednak znacznego nakładu pracy i środków. Z jednej strony bowiem, uzyskane dane w istotny sposób wzbogacą naszą wiedzę na temat biologii systemów symbiotycznych, z drugiej zaś, mogą przyczynić się do uzyskania wyższej wydajności upraw roślin motylkowatych, przy niższych kosztach ich uzyskania. Warto sprecyzować, że koszty te to nie tylko nakłady na nawozy mineralne. Istotnym zyskiem, jaki można osiągnąć przez zastosowanie wysoko wydajnych inokulów jest zmniejszenie zanieczyszczenia gleby na terenach upraw. Warto również pamiętać o tym, że pośrednim, lecz nie mniej przez to atrakcyjnym rezultatem badań nad współzawodnictwem szczepów *Rhizobium*, jest możliwość wykorzystania uzyskanych informacji w dalszych badaniach molekularnych mechanizmów interakcji mikroorganizmów glebowych, oraz interakcji rośliny-mikroorganizmy. Obejmuje to nie tylko problematykę symbiotycznej diazotrofii, lecz także zagadnienia mikoryzy wesykularno-arbuskularnej, mikroorganizmów grupy PGPR, czy też zastosowania mikroorganizmów dla celów biokontrolnych — zastępując nimi sukcesywnie stosowane dziś powszechnie pestycydy i fungicydy syntetyczne. Poszerzenie naszej wiedzy w tym zakresie jest warunkiem niezbędnym dla utrzymania środowiska rolniczego w stanie zrównoważonym, przy jednocześnie wysokiej jego produktywności.

W pracy użyto nazw łacińskich gatunków rodziny *Rhizobiaceae* takich samych, jak w cytowanej literaturze. Warto jednak nadmienić, że w ciągu ostatnich dwóch lat systematyka tej rodziny mikroorganizmów uległa daleko idącym przekształceniom. Wprowadzono nowe Rodzaje: *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium*, ponadto w obrębie wcześniej Rodzajów wydzielono nowe gatunki. Dla przykładu, dotychczasowy gatunek *Rhizobium meliloti* został przekształcony w *Sinorhizobium meliloti*, wyróżniono ponadto gatunek *Sinorhizobium medicae* (o zbliżonej specyficzności); Zamiast nazwy *Rhizobium fredii* stosuje się obecnie nazwę *Sinorhizobium fredii*.

Literatura

1. Newton W. E., (1993), in: *New Horizons in Nitrogen Fixation*, Eds. Palacios R., Mora J., Newton W. E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 5-18.
2. Ishizuka J., (1992), *Plant Soil*, 141, 197-209.
3. Vance C. P., (1997), in: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*, Eds. Legocki A., Bothe H., Pühler A., Springer, Berlin, Heidelberg.
4. Singleton P.W., Somasegaran P., Nakao P. L., Keyser H. H., Hoben H. J., Ferguson P. I., (1990), *Applied BNF Technology a Practical Guide for Extension Specialists*, NifTAL Project, University of Hawaii, US AID.
5. van Kammen A., (1997), in: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*, Eds. Legocki A., Bothe H., Pühler A., Springer, Berlin, Heidelberg, 177-178.

6. Bohlool B. B., Ladha J. K., Garrity D. P., George T., (1992), *Plant Soil*, 141, 1-11.
7. Peoples M. B., Craswell E. T., (1992), *Plant Soil*, 141, 13-39.
8. Bell F., Nutman P. S., (1971), *Plant Soil, Spec. Vol.*, 231-264.
9. Roughley R. J., Blowes W. M., Herridge D. F., (1976), *Soil Biol. Biochem.*, 8, 403-407.
10. Bromfield E. S. P., Ayanaba A. A., (1980), *Plant Soil*, 54, 95-106.
11. Brockwell J., Roughley R. J., Herridge D. F., (1987), *Aust. J. Agr. Res.*, 38, 61-74.
12. Somasegaran P., Hoben H. J., Gurgun V., (1988), *Agron. J.*, 80, 68-73.
13. Johnson H. W., Means V. M., Weber C. R., (1965), *Agron. J.*, 57, 179-185.
14. Holland A. A., (1970), *Plant Soil*, 32, 292-302.
15. Boonkerd N., Weber D. F., Bezdicek D. F., (1978), *Agron. J.*, 70, 547-549.
16. Noel K. D., Brill W. J., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 931-938.
17. Bromfield E. S. P., Sinha J., Wolynetz M. S., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1077-1084.
18. Dudman W. F., Brockwell J., (1968), *Aust. J. Agr. Res.*, 19, 739-747.
19. Gibson A. H., Date R. A., Brockwell J., (1976), *Soil Biol. Biochem.*, 8, 395-401.
20. Materon L. A., Hagedorn C., (1982), *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46, 553-556.
21. van Rensburg M. J., Strijdom B. W., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 98-106.
22. McLoughlin T. J., Bordeleau L. M., Dunican L. K., (1984), *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 131-135.
23. Mądrzak C. J., (1995), *Molekularne mechanizmy symbiozy Rhizobiaceae z roślinami motylkowatymi*, Wyd. AR, Poznań.
24. Mądrzak C. J., (1998), w: *Na pograniczu chemii i biologii*, t. II, red. Barciszewski J., Koroniak H., Markiewicz W. T., Ziemiński K., Wyd. UAM, Poznań, 43-66.
25. Richards B. N., (1979), *Wstęp do ekologii gleby*, PWN, Warszawa.
26. Glenn A. R., Dilworth M. J., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 123, 1-10.
27. Howieson J. G., (1995), *Soil Biol. Biochem.*, 27, 603-610.
28. Frey S. D., Blum L. K., (1994), *Plant Soil*, 163, 157-164.
29. Reeder R., (1984), *Cell*, 38, 349-351.
30. Sa T. M., Israel D. W., (1991), *Plant Physiol.*, 97, 928-935.
31. Bushby H. V. A., (1993), *Soil Biol. Biochem.*, 25, 597-605.
32. Lie T. A., (1981), in: *Nitrogen Fixation*, Vol. 1, *Ecology*, Ed. Broughton W. J., Clarendon Press, Oxford, 104-133.
33. Sinclair T. R., Serraj R., (1995), *Nature*, 378, 344.
34. Subbarao G. V., Johansen C., Slinkard A. E., Rao R. C. N., Saxena N. P., Chauhan Y. S., (1995), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14, 469-523.
35. Ibjibijen J., Ismaili M., (1995), *Arid. Soil Res. Rehabil.*, 9, 399-408.
36. Athar M., Johnson D. A., (1996), *J. Plant Nutr.*, 19, 185-199.
37. Dudeja S. S., Khurana A. L., (1989), *J. Exp. Bot.*, 40, 469-472.
38. Pankhurst C. E., Gibson A. H., (1973), *J. Gen. Microbiol.*, 74, 219-231.
39. Munevar F., Wollum A. G., II, (1981), *J. Soil Sci. Soc. Amer.*, 45, 1113-1129.
40. Rao V. R., (1977), *J. Exp. Bot.*, 28, 241-259.
41. Schulman H. M., Lewis M. C., Tipping E. M., Bordeleau L. M., (1988), *Plant Cell Environ.*, 11, 721-728.
42. Bordeleau L. M., Prevost D., (1994), *Plant Soil*, 161, 115-125.
43. Gibson A. H., (1968), *Aust. J. Agr. Sci.*, 19, 907-918.
44. Lewis-Henderson W. R., Djordjevic M. A., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 2791-2799.
45. Lewis-Henderson W., Djordjevic M. A., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 515-526.
46. Vincent J. M., (1974), in: *The Biology of Nitrogen Fixation*, Ed. Quispel A., North Holland, Amsterdam, 265-341.
47. Bottomley P. J., (1992), in: *Biological Nitrogen Fixation*, Eds. Stacey G., Burris R. H., Evans M. J., Chapman and Hall, New York, 293-347.
48. Barnett Y. M., (1991), in: *Studies in Plant Sciences I. Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, Eds. Dilworth M., Glenn A. R., Elsevier, Amsterdam, 199-208.
49. Weaver R. W., Frederick L. R., Dumeril L. C., (1972), *Soil Sci.*, 114, 137-141.
50. Kuykendall L. D., Devine T. E., Cregan P. B., (1982), *Curr. Microbiol.*, 7, 79-81.

51. Woomer P. L., Singleton P. W., Bohlool B. B., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1112-1116.
52. Kucey R. M. N., Hynes M. F., (1989), *Can. J. Microbiol.*, 35, 661-667.
53. Thies J. E., Singleton P. W., Bohlool B. B., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 19-28.
54. Singleton P. W., Tavares J. W., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1013-1018.
55. Kamicker B. J., Brill W. J., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1737-1742.
56. McLoughlin T. J., Alt S. G., Merlo P. A., (1990), *Can. J. Microbiol.*, 36, 794-800.
57. McLoughlin T. J., Hearn S., Alt S. G., (1990), *Can. J. Microbiol.*, 36, 839-845.
58. McLoughlin T. J., Alt S. G., Gonzalez R. G., Romero-Severson J., (1991), *Can. J. Microbiol.*, 37, 984-988.
59. Nehl D. B., Allen S. J., Brown J. F., (1996), *Appl. Soil Ecol.*, 5, 1-20.
60. Chanway C. P., (1997), *For. Sci.*, 43, 99-112.
61. Klopper J. W., Lifshitz R., Schroth M. N., (1988), *ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences*, 60-64.
62. Klopper J. W., Lifshitz R., Zablotowicz R. M., (1989), *T. I. BTECH*, 7, 39-43.
63. Kurek E., Kobus J., (1990), *Post. Mikrobiol*, 29, 103-119.
64. Glick B. R., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, 109-117.
65. Marek-Kozaczuk M., (1998), *Czynniki syntetyzowane przez Pseudomonas sp. szczep 267 stymulujące wzrost koniczyny w symbiozie z Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*, rozprawa doktorska, UMCS Lublin.
66. Nautiyal C. S., (1997), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23, 145-158.
67. Streit W. R., Joseph C. M., Phillips D. A., (1996), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 9, 330-338.
68. McKhann H. I., Paiva N. L., Dixon R. A., Hirsch A. M., (1997), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 10, 50-58.
69. Halverson L. J., Handelsman J. O., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2767-2770.
70. Fuhrmann J. J., Wollum A. G., II, (1989), *Biol. Fertil. Soils*, 7, 108-112.
71. Handelsman J., Brill W. J., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 818-821.
72. Hashem F. M., Angle J. S., (1988), *Soil Biol. Biochem.*, 20, 69-73.
73. Hashem F. M., Angle J. S., Ristiano P. A., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 326-329.
74. Hodgson A. L. M., Roberts W. P., Waid J. S., (1985), *Soil Biol. Biochem.*, 17, 475-478.
75. Joseph M. V., Desai J. D., Desai A. J., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 532-535.
76. Riley M. A., Gordon D. M., (1999), *T.I.M.*, 7, 129-133.
77. Triplett E. W., Banta T. M., (1987), *Plant Physiol.*, 85, 335-342.
78. Triplett E. W., Schink M. J., Woeldner K. L., (1989), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 2, 202-208.
79. Triplett E. W., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 98-103.
80. Robbleto E. A., Scupham A. J., Triplett E. W., (1997), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 10, 228-233.
81. Danso S. K. A., Alexander M., (1975), *Appl. Microbiol.*, 29, 515-521.
82. Danso S. K. A., Alexander M., (1975), *Can. J. Microbiol.*, 21, 884-895.
83. Ramirez C., Alexander M., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 492-499.
84. Dowling D. N., Broughton W. J., (1986), *Ann. Rev. Microbiol.*, 40, 131-157.
85. Thies J. E., Bohlool B. B., Singleton P. W., (1992), *Can. J. Microbiol.*, 38, 493-500.
86. Triplett E. W., Sadowsky M. J., (1992), *Ann. Rev. Microbiol.*, 46, 399-428.
87. Streeter J. G., (1994), *Can. J. Microbiol.*, 40, 513-522.
88. Brockwell J., Bottomley P. J., Thies J. E., (1995), *Plant Soil*, 174, 143-180.
89. Cregan P. B., Keyser H. H., Sadowsky M. J., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2532-2536.
90. Caldwell B. E., (1966), *Crop Sci.*, 6, 427-428.
91. Caldwell B. E., Hinson K., Johnson H. W., (1966), *Crop Sci.*, 6, 495-496.
92. Vest G., (1970), *Crop Sci.*, 10, 34-35.
93. Vest G., Caldwell B. E., (1972), *Crop Sci.*, 12, 692-693.
94. Pracht J. E., Nickell C. D., Harper J. E., (1993), *Crop Sci.*, 33, 711-713.
95. Pueppke S. G., Payne J. H., (1987), *Plant Physiol.*, 84, 1291-1295.
96. Devine T. E., Breithaupt B. H., Kuykendall L. D., (1981), *Crop Sci.*, 21, 696-699.

97. Judd A. K., Sadowsky M. J., Bhagwat A. A., Cregan P. B., Liu R. L., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 106, 205-210.
98. Lohrke S. M., Orf J. H., Martinez-Romero E., Sadowsky M. J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2378-2383.
99. Sadowsky M. J., Koslak R. M., Mądrzak C. J., Golińska B., Cregan P. B., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 832-836.
100. Montealegre C., Kipe-Nolt J., (1994), *Arch. Microbiol.*, 162, 352-356.
101. Lie T. A., (1978), *Ann. Appl. Biol.*, 88, 462-465.
102. Young J. P. W., Johnston A. W. B., Brewin N. J., (1982), *Heredity*, 48, 197-201.
103. Brewin N. J., Beringer J. E., Johnston A. W. B., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1817-1827.
104. Holl F. B., (1975), *Euphytica*, 24, 767-770.
105. Davis E. O., Evans J. J., Johnston A. W. B., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 531-535.
106. Firmin J. L., Wilson K. E., Carlson R. W., Davies A. E., Downie J. A., (1993), *Molec. Microbiol.*, 10, 351-360.
107. Djordjevic M. A., Schofield P. R., Ridge N. A., Bassam B. J., Plazinski J., Watson J. M., Rolfe B. G., (1985), *Plant Mol. Biol.*, 4, 147-160.
108. Bromfield E. S. P., Barran L. R., Wheatcroft R., (1995), *Molec. Ecol.*, 4, 183-188.
109. Hynes M. F., O'Connell M. P., (1990), *Can. J. Microbiol.*, 36, 864-869.
110. Sadowsky M. J., Cregan P. B., Göttfert M., Sharma A., Gerhold D., Rodriguez-Quinones F., Keyser H. H., Hennecke H., Stacey G., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 637-641.
111. Dockendorff T. C., Sanjuan J., Grob P., Stacey G., (1994), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 7, 596-602.
112. Heron D. S., Ersek T., Krishnan H. B., Pueppke S. G., (1989), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 2, 4-10.
113. Krishnan H. B., Pueppke S. G., (1991), *Can. J. Microbiol.*, 38, 515-519.
114. Krishnan H. B., Pueppke S. G., (1992), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 5, 14-21.
115. Gray J. X., Rolfe B. G., (1990), *Molec. Microbiol.*, 4, 1425-1431.
116. Mateo R., Sico E., Wang L. F., Fung J., (1994), *Focus*, 16, 104-106.
117. Gray J. X., de Maagd R. A., Rolfe B. G., Johnston A. W. B., Lugtenberg B. J. J., (1992), in: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, Ed. Verma D. P. S., CRC Press, London, 359-376.
118. Noel K. D., (1992), in: *Molecular Signals in Plant-Microbe Interactions*, Ed. Verma D. P. S., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, 341-357.
119. Denarie J., Debelle F., Rosenberg C., (1992), *Ann. Rev. Microbiol.*, 46, 497-531.
120. Diebold R., Noel K. D., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 4821-4830.
121. Noel K. D., VandenBosch A., Kulpacz B., (1986), *J. Bacteriol.*, 168, 1392-1401.
122. Djordjevic S. P., Chen H., Batley M., Redmond J. W., Rolfe B. G., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 53-60.
123. Battisti L., Lara J. C., Leigh J. A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5625-5629.
124. Urzainqui A., Walker J. C., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 3403-3406.
125. Leigh J. A., Walker G. C., (1994), *T.I.G.*, 10, 63-67.
126. Leigh J. A., Barker D. G., Journet E. P., Truchet G., (1994), in: *Advances in Molecular Genetics of Plant — Microbe Interactions*, vol. 3, Eds. Daniels M. J., Downie J. A., Osburn J. E., Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 143-150.
127. Murphy P. J., Saint C. P., (1992), in: *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, Ed. Verma D. P. S., CRC Press, London, 377-390.
128. Murphy P. J., Wexler W., Grzemski W., Rao J. P., Gordon D., (1995), *Soil Biol. Biochem.*, 27, 525-529.
129. Gordon D. M., Ryder M. H., Heinrich K., Murphy P. J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3991-3996.
130. You Z., Gao X., Ho M. M., Borthakur D., (1998), *Microbiology*, 144, 2619-2627.
131. Bittinger M. A., Milner J. L., Saville B. J., Handelsman J., (1997), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 10, 180-186.

132. Toro N., Olivares J., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202, 331-335.
133. Sanjuan J., Olivares J., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 4154-4161.
134. Soto M. J., Zorzano A., Mercado-Blanco J., Lepek V., Toro N., (1993), *J. Mol. Biol.*, 229, 570-576.
135. Soto M. J., Zorzano A., Garcia-Rodriguez F. M., Mercado-Blanco J., Lopez-Lara I. M., Olivares J., Toro N., (1994), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 7, 703-707.
136. Chun J. Y., Stacey G., (1994), *Molec. Plant-Microbe Interact.*, 7, 248-255.
137. Wilson K. J., (1995), *Soil Biol. Biochem.*, 27, 501-514.
138. Wilson K. J., Peoples M. B., Jefferson R. A., (1995), *Plant Soil*, 174, 241-253.

Competition between bacterial strains nodulating leguminous plants

Summary

Successful nodulation of legumes by *Rhizobium* is a complex process that in open field depends on various environmental and biological factors. Generally legume productivity may be improved by inoculation with selected, highly effective in diazotrophy root nodule bacteria. However, field legume inoculation with *Rhizobiaceae* species is very often unsuccessful due to the presence of native strains in soil which are better adapted and usually dominate over introduced bacteria. The ability of one strain to outnumber others in nodule occupancy is commonly termed competitiveness. This feature of strain is genetically regulated by numerous bacterial genes, as well as it is highly dependent on host plant genotype and environmental cues. The competitiveness of endogenous strains is critical for the successful use of inocula to introduce the quality strains. In this paper we describe ways and means which should be considered in order to manipulate both established and introduced strains ecologically, edaphically and genetically to improve legume productivity and, as the consequence, soil fertility.

Key words:

Rhizobium, *Bradyrhizobium*, legumes, N₂ fixation, inoculation, nodulation, symbiosis, bacterial competitiveness, soil ecology, molecular genetics of soil bacteria.

Adres do korespondencji:

Cezary J. Mądrzak, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań.