

Grażyna Stasiak¹, Andrzej Mazur², Piotr Koper², Kamil Żebracki², Anna Skorupska^{2*}

¹Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wpłynęło w październiku 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Znaczenie biologicznego wiązania azotu (BNF). 2. Partnerzy symbiozy. 3. Etapy symbiozy. 3.1. Inicjacja symbiozy. 3.2. Rozwój brodawki. 3.3. Typy brodawek korzeniowych. 4. Wiązanie azotu. 5. Genomy rizoziobów. 6. Chromidy i megaplazmidy. 7. Plastyczność genomów rizoziobów. 8. Podsumowanie

Symbiosis of rhizobia with legume plants (Fabaceae)

Abstract: Biological nitrogen fixation is one of the most important processes in which atmospheric nitrogen is reduced to ammonia by symbiotic bacteria called rhizobia, which belong to α - and β -proteobacteria. Legume plants (Fabaceae) have the capacity to enter into mutualistic symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, enabling them to grow in nitrogen-limited agricultural soils. In these specific associations, new organs called root or shoot nodules are developed. Infection of plants by rhizobia is a series of sequential stages in which rhizobial lipochitooligosaccharide, called the Nod factor, activates plant transmission signaling and initiates nodule development. In the nodules the bacteria multiply and differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. In return for reduced nitrogen compounds provided to the plants, rhizobia are supplied with plant carbon photosynthetic products and are protected from environmental stresses.

Genomes of rhizobia and other soil bacteria are large and multipartite, composed of the chromosome and plasmids (megaplasmids), which may comprise up to 50% of the genome. A common feature of the rhizobial genomes is that genes responsible for nodulation and nitrogen fixation are clustered on symbiotic plasmids (pSym) or incorporated into the chromosome as symbiotic islands. Plasmids are heterogeneous in size and gene content even in closely related rhizobia. Recently described extrachromosomal replicons, named "chromids", have some chromosome and plasmid properties and are essential for bacterial growth under natural and laboratory conditions. The special architecture of rhizobial genomes may cause their dynamic state and plasticity, leading to significant diversity of rhizobia on the genetic and metabolic levels.

1. The importance of biological nitrogen fixation (BNF). 2. Symbiosis partners. 3. Symbiosis stages. 3.1. Initiation of symbiosis. 3.2. Nodule development. 3.3. Types of nodules. 4. Nitrogen fixation. 5. Rhizobial genomes. 6. Chromids and megaplasmids. 7. Plasticity of rhizobial genomes. 8. Summary

Słowa kluczowe: brodawki korzeniowe, genomy rizoziobów, symbiotyczne wiązanie azotu

Key words: root nodules, rhizobial genomes, symbiotic nitrogen fixation

1. Znaczenie biologicznego wiązania azotu

Azot (N), jako składnik wielu biocząsteczek, takich jak białka, kwasy nukleinowe i witaminy, jest niezbędnym elementem warunkującym istnienie wszelkich form życia. Pomimo dużej zawartości azotu cząsteczkowego (N_2) w atmosferze, jego redukcja do form łatwo przyswajalnych przez organizmy jest trudna, ze względu na potrójne kowalencyjne wiązanie między atomami N. Zdolność redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku mają wyłącznie organizmy prokariotyczne: bakterie i archeony [43, 44]. Proces mikrobiologicznej redukcji azotu do form dostępnych dla roślin jest nazywany biologicznym wiązaniem azotu (BNF, *biological nitrogen fixation*) i obok fotosyntezy stanowi podstawę życia na ziemi. Ograniczona dostępność zredukowanych związków azotowych (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+) w glebie często jest głównym czynnikiem limitującym

wzrost i produktywność roślin [44, 91], w tym także tych uprawianych w celach żywieniowych. Niektóre rośliny mogą wykorzystywać N_2 obecny w atmosferze poprzez tworzenie symbiozy z bakteriami, które mogą wiązać i redukować azot cząsteczkowy. Takie rośliny nie wymagają nawożenia azotowego i rozwijają się dobrze na glebach ubogich w azot, znacznie zwiększając poziom globalnego obiegu azotu w przyrodzie [70]. Najlepiej poznaną grupą roślin tworzącą układy symbiotyczne są rośliny bobowate (motylkowate), Fabaceae, które wchodzi w interakcję z Gram-ujemnymi bakteriami, ogólnie nazywanymi rizoziobami, należącymi do klas α - i β -proteobakterii [12, 38, 57]. W odróżnieniu od wielu wolno żyjących diazotrofów, rizoziobia są zdolne do wysoko wydajnego wiązania azotu wyłącznie wtedy, gdy znajdują się w komórkach brodawki korzeniowej gospodarza roślinnego, w formie endosymbiotycznych bakteroidów [71].

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 81 537 59 72; e-mail: anna.skorupska@poczta.umcs.lublin.pl

Całkowite globalne wiązanie N_2 w procesie BNF zostało oszacowane na 100–290 Tg N/rok ($1 \text{ Tg} = 10^{12} \text{ g}$), w tym około 50–70 Tg N/rok stanowi azot wiązany w uprawach rolniczych [43]. BNF jest uzupełniane przez sztuczne nawożenie azotowe w ilości 85 Tg N/rok [70]. Na przemysłową produkcję nawozów azotowych stosowanych w rolnictwie zużywane jest około 50% paliw kopalnych, a azot wprowadzany do gleby w postaci sztucznych nawozów jest tylko w części (poniżej 50%) wykorzystywany przez rośliny [91]. Pozostała część jest tracona z gleby w wyniku wymywania lub mikrobiologicznej nityfikacji i denityfikacji, co może być przyczyną zanieczyszczenia środowiska. Eutrofizacja i hipoksja w ekosystemach wodnych powoduje zmniejszenie bioróżnorodności organizmów. Obecność azotanów (NO_3^-) w zbiornikach wodnych ma również negatywny wpływ na stan powietrza atmosferycznego poprzez emisję tlenków azotu NO_x [91]. BNF jest procesem przyjaznym dla środowiska i stanowi podstawę zrównoważonego, ekologicznego rolnictwa. Uprawy bobowatych, dzięki symbiozie z rizobiami wymagają 35–60% mniej energii w porównaniu do upraw, w których stosuje się nawozy sztuczne [44]. Rośliny bobowate, poza dużym znaczeniem w produkcji wartościowej, wysokobiałkowej żywności (np. groch, fasola, soja) oraz pasz (np. koniczyna, lucerna, wyka), są również cenione, jako wysokobiałkowy zielony nawóz.

2. Partnerzy symbiozy

Do nawiązania efektywnej symbiozy potrzebne są dwa biologicznie zgodne organizmy, tj. bakterie zdolne do wiązania N_2 oraz rośliny, zapewniające odpowiednie warunki dla tego procesu, tzn. beztlenowe środowisko i energię konieczną dla przebiegu reakcji redukcji azotu cząsteczkowego. Symbioza oznacza duże koszty energetyczne, ale także ogromne korzyści dla obu partnerów [16].

Rizobia są bakteriami heterotroficznymi, wykazującymi dużą plastyczność metaboliczną, która pozwala im przetrwać w różnych warunkach środowiskowych. Różnią się od innych mikroorganizmów glebowych tym, że bytują w dwóch formach: wolno żyjącej, saprofitycznej – w glebie, oraz symbiotycznej – w brodawkach roślin bobowatych. Rizobia to ponad 90 gatunków sklasyfikowanych w kilku rodzajach klasy α -proteobakterii: *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer* (wcześniej *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga* i *Bradyrhizobium* [93]. W ostatnich latach udokumentowano zdolność do tworzenia brodawek na korzeniach roślin bobowatych i do symbiotycznego wiązania azotu w przypadku kilku gatunków bakterii należących do klasy β -proteobakterii z rodzajów *Burkholderia*

i *Cupriavidus* [12, 38, 64]. Rośliny bobowate (Fabaceae), które są gospodarzami dla tej grupy rizobiów, są bardzo zróżnicowane taksonomicznie [93].

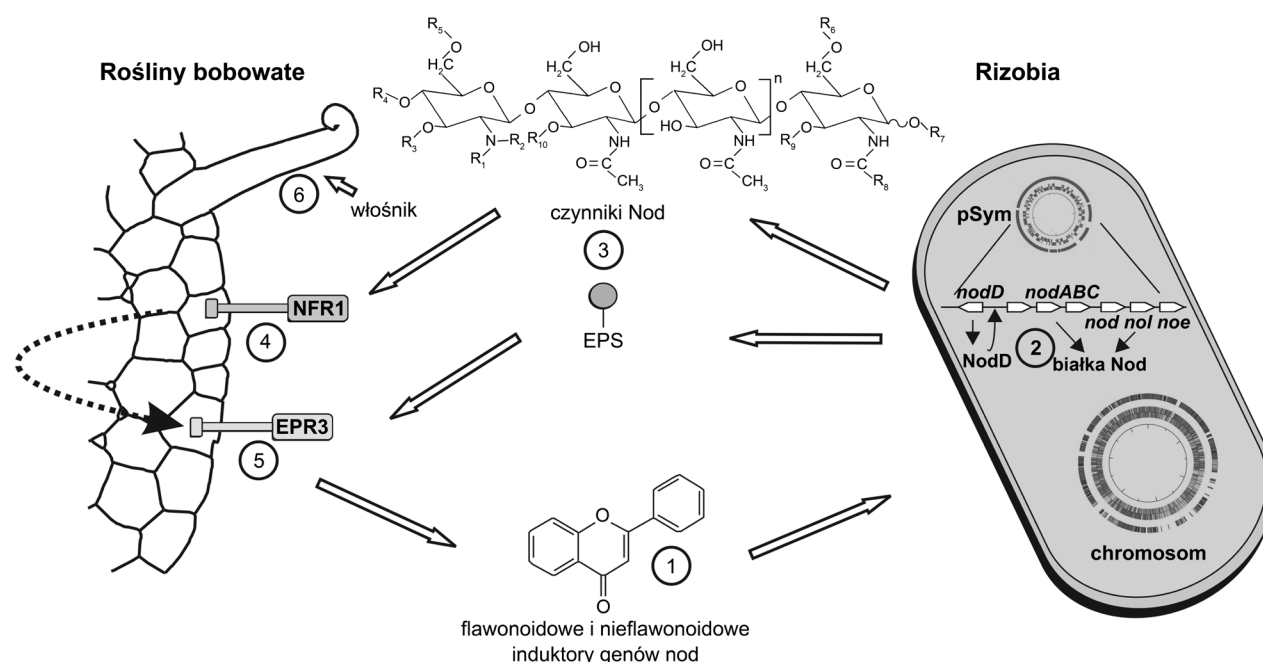
Znakiem szczególnym symbiozy jest wysoka specyficzność. Poszczególne gatunki rizobiów tworzą brodawki na określonej liczbie gatunków roślin-gospodarzy. Zgodność genetyczna pomiędzy roślinami bobowatymi i mikrosymbiontami zależy zarówno od swoistych bakteriowych sygnałów molekularnych, jak i specyficznej odpowiedzi rośliny-gospodarza [10, 66, 78]. O charakterystycznej dla rizobiów wysokiej specyficzności brodawkowania mówimy, gdy mikrosymbiont i gospodarz mają zestaw genów, który pozwala na nawiązanie efektywnej symbiozy [10]. Głównymi bakteriowymi sygnałami molekularnymi w symbiozie są czynniki Nod (NF, *Nodulation Factors*) produkowane przez rizobia w odpowiedzi na związki flawonoidowe wydzielane przez nasiona i korzenie gospodarza roślinnego [45, 71]. Wyjątkowo szeroki zakres gospodarza wykazuje gatunek *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *fredii* NGR234 tworzący brodawki na ponad 120 rodzajach roślin motylkowatych, a także na niemotylkowatej *Parasponia andersonii* [75]. Skrajnie specyficznym gatunkiem jest *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, który zakaża tylko różne gatunki rodzaju *Trifolium* – koniczyna. Rośliny motylkowate także mogą wykazywać niską specyficzność w stosunku do mikrosymbionta, np. *Macroptilium* lub *Phaseolus* tworzą brodawki w układach symbiotycznych z kilkoma gatunkami rizobiów [71].

3. Etapy symbiozy

Nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy rizobiami i rośliną jest złożonym i ściśle kontrolowanym procesem. Obejmuje skoordynowaną wymianę sygnałów pomiędzy rośliną i bakteriami, prowadzącą do stopniowego różnicowania morfologicznego rośliny i bakterii oraz dostosowania metabolizmu obu partnerów [9].

3.1. Inicjacja symbiozy

Pierwszym etapem infekcji jest adsorpcja rizobiów na włosnikach korzeniowych, w której biorą udział różne cząsteczki i struktury powierzchniowe obu symbiontów, takie jak: powierzchniowe białko wiążące Ca^{2+} – rikadhezyna, fimbrie baktericyjne, lektyny roślinne oraz baktericyjne polisacharydy, w tym fibryle celulozowe [80]. Głównymi cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w inicjację symbiozy są roślinne flawonoidy oraz czynniki Nod syntetyzowane przez rizobia [13, 52]. Flawonoidy są roślinnymi metabolitami wtórnymi, których synteza jest indukowana przez czynniki stresogenne, m.in. głód azotowy. Związki te działają jako chemoatraktanty dla rizobiów; w największej ilości



Rys. 1. Inicjacja symbiozy ryzobii z roślinami bobowatymi.

(1) wydzieliny korzeni roślin zawierające związki flawonoidowe aktywują białko NodD; (2) Białko NodD indukuje ekspresję genów *nod* odpowiedzialnych za syntezę czynnika Nod (NF); (3) czynnik Nod oraz EPS poprzez swoje receptory NFR i EPR (4 i 5) inicjuje kaskadę sygnałów prowadzących do powstania charakterystycznego zagięcia włosników korzeniowych (6) oraz powstania zawiązka brodawki korzeniowej.

są wydzielane w pobliżu wierzchołków korzeni, a ich optymalne stężenie występuje w strefie pojawiania się włosników korzeniowych w miejscu infekcji ryzobii [96]. Wydzieliny korzeni roślin motylkowatych zawierają specyficzny gatunkowo koktajl flawonoidów, a ilość i spektrum działania tych związków może różnić się w zależności od wieku i stanu fizjologicznego rośliny [96]. W dialogu molekularnym między rośliną i bakterią poza flawonoidami mogą brać udział inne metabolity roślinne, m.in. betainy (stachydryna i trygonelina), kwasy aldonowe (erytronowy i tetronowy), ksantony, proste związki fenolowe (wanilina i izowanilina) i kwas jasmonowy [13, 81]. Ze strony mikrosymbiontów na inicjację symbiozy mają wpływ, poza czynnikami Nod, także polisacharydy powierzchniowe [26, 80], białka sekrecyjne, *N*-acylowane laktony homoseryny (AHL), które pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych w procesie *quorum sensing* oraz inne związki [11, 20, 26] (Rys. 1).

Flawonoidy produkowane przez roślinnego gospodarza aktywują geny brodawkowania (*nod*, *nodulation genes*) kompetentnych symbiontów poprzez wiązanie z białkiem regulatorowym NodD, należącym do rodziny białek regulatorowych LysR [45, 69]. Białko NodD przyłącza się do konserwowanych sekwencji DNA, tzw. kaset *nod* (*nod box*), które zidentyfikowano w regionach promotorowych indukowalnych genów *nod* [2, 10, 32]. Wiązanie NodD z DNA nie wymaga obecności flawonoidów, natomiast aktywacja promotorów genów *nod* jest możliwa wyłącznie w ich obecności [9]. Zaktywowany flawonoidem NodD indukuje syn-

tezę i wydzielanie lipochitoooligosacharydowych czynników Nod (LCO). NF są zbudowane z reszt *N*-acetylo-*D*-glukozaminy połączonych wiązaniami β -1,4 i modyfikowanych kwasem tłuszczowym na końcu nieredukującym. Różnice w strukturze chemicznej NF produkowanych przez różne gatunki ryzobii dotyczą długości rdzenia oligosacharydowego (dwie do sześciu reszt *N*-acetyloglukozaminy), typu kwasu tłuszczowego na końcu nieredukującym oraz liczby i typu podstawników (np. reszta acetylowa, arabinozowa, fukozyłowa, mannozyłowa, sulfonowa i in.) modyfikujących cząsteczkę w redukującym końcu NF [13, 15].

Synteza NF zachodzi na skutek działania produktów dwóch grup genów *nod*, kontrolowanych przez NodD aktywowane flawonoidem. Są to geny wspólne nodulacji (*common nodulation genes*), czyli geny operonu *nodABC* występujące niemal we wszystkich gatunkach ryzobii, odpowiedzialne za syntezę enzymów niezbędnych do tworzenia struktury rdzeniowej NF (szkielet *N*-acetyloglukozaminowy). Natomiast produkty innych genów: *nod*, *noe* i *nol* (w *E. meliloti*: *nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*, *nodL*) wprowadzają modyfikacje chemiczne w NF, które nadają ryzobiom specyficzność w stosunku do gospodarza [20, 71]. Wiele gatunków ryzobii produkuje więcej niż jeden typ NF (nawet do 60 różnych typów), ale dotychczas nie wykazano zależności między strukturą NF i zakresem potencjalnych roślinnych gospodarzy [45, 87]. NF są morfogenami biologicznie aktywnymi w bardzo niskich stężeniach: 10^{-9} – 10^{-12} M, co sugeruje, że w ich percepcję

zaangażowane są receptory roślinne (NFR, *Nod Factor Receptors*) o dużym powinowactwie [31, 42, 66]. NF są rozpoznawane przez receptory typu kinaz LysM w epidermie korzenia i wyzwalają kaskadę sygnałów, która w roślinie wywołuje szereg reakcji prowadzących do utworzenia brodawki [31, 36, 76].

Specyficzność infekcji roślin bobowatych przez kompetentne mikrosymbionty jest realizowana nie tylko na wyżej opisanej drodze poprzez molekularne sygnały, jakimi są flawonoidy i bakteryjny NF, uwalniający kaskadę reakcji poprzez wysoko specyficzne roślinne receptory kinazowe typu LysM (NFR). Rozwój prawidłowo funkcjonującej brodawki, w której bakteroidy wiążą azot zależy także od struktur powierzchniowych bakterii, takich jak zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (CPS) oraz lipopolisacharydy (LPS) [26, 80]. Skład cukrów i struktura EPS jest szeregowo zróżnicowana u rizobiów, sugerując specyficzne funkcje w interakcji z roślinami bobowatymi. Mutanty bakterii pozbawione EPS lub zawierające zmienioną strukturę egzopolisacharydu indukują defektywne brodawki, w których bakterie nie są zdolne do wiązania azotu [20, 45, 80]. Ostatnio, specyficzny mechanizm działania EPS w symbiozie rizobiów z roślinami brodawkowymi przedstawili Kawaharada i wsp. [47]. Na modelu symbiozy *Lotus japonicus* – *Mesorhizobium loti* udowodniono, że roślina gospodarza może monitorować strukturę EPS wydzielanego przez bakterie na etapie inicjacji infekcji poprzez receptor NPR3. Receptor ten jest specyficzną dla EPS kinazą membranową typu LysM o dużym podobieństwie do NFR1 – receptora czynnika Nod. Co więcej, stwierdzono, że w roślinnych mutantach w NPR3 tworzących nieefektywną symbiozę domeny LysM są zmienione, wskazując na korelację zmiany w LysM ze zmianą funkcji receptora EPS. Ekspresja receptora NPR3 jest zależna od czynnika Nod. Sygnał inicjujący powstanie brodawki, jakim jest czynnik Nod, poza aktywacją całego szlaku transmisji sygnału, inicjowałby także transkrypcję receptora dla specyficznego sygnału, jakim jest bakteryjny EPS [47] [Rys. 1].

3.2. Rozwój brodawki

Pierwszą widoczną zmianą morfologiczną rośliny wywołaną adsorpcją bakterii na włosnikach i syntezą NF jest charakterystyczna deformacja włosników korzeniowych, tzw. „laska pasterza” (*shepherd's crook*), wynikająca z depolaryzacji błony cytoplazmatycznej, szybkich fluktuacji poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} we włosnikach (*calcium spiking*), przebudowy cytoszkieletu włosnika i tworzenia nici preinfekcyjnej w zdeformowanym włosniku [40, 66]. Bakterie schwytane w kieszeń powstałą w wyniku skręcenia włosnika namnażają się produkując znaczną ilość NF. Powodują miejscową hydrolizę ścian i wpuklenie błony komór-

kowej, co inicjuje powstanie nici infekcyjnej (IT, *infection thread*) – rurkowatej struktury pochodzenia roślinnego wypełnioną dzielącymi się bakteriami [28]. Nić infekcyjna początkowo rozwija się w zainfekowanym włosniku korzeniowym, a następnie przemieszcza się poprzez kilka warstw komórek kory korzenia. Bakterie są uwalniane z nici infekcyjnej i przenoszone w procesie endocytozy do komórek powstałego zawiązka brodawki korzeniowej (primordium) [28, 63]. W czasie powstawania brodawki następuje zahamowanie aktywności systemu immunologicznego rośliny tworzącego reaktywne formy tlenu, następują zaburzenia przepływu auksyn w korzeniach oraz indukcja genów roślinnych kodujących noduliny, czyli białka istotne we wszystkich etapach symbiozy [28, 66]. Czynniki Nod wpływają również na wykształcenie dojrzałego biofilmu rizobiowego na korzeniach roślin bobowatych [27].

Opisano dwa główne typy infekcji roślin motylkowatych wymagające udziału NF [20, 57]: zakażenie poprzez włosniki korzeniowe, które zachodzi zwykle u roślin klimatu umiarkowanego oraz penetracja korzenia rośliny w wyniku międzykomórkowej infekcji w miejscu uszkodzenia epidermy (*crack entry*), np. w miejscu powstawania korzenia bocznego u tropikalnych roślin motylkowatych (*Sesbania rostrata*, *Neptunia* sp.). Ten mechanizm infekcji jest uważany za starszy ewolucyjnie [82]. Wyjątek stanowi wodna roślina motylkowata *Aeschynomene afraspera* zakażana przez szczep *Bradyrhizobium* sp. ORS278, w której zaobserwowano infekcję niezależną od NF i bez tworzenia nici infekcyjnej, co uznano za najstarszy ewolucyjnie typ infekcji [33] [Rys. 1].

3.3. Typy brodawek korzeniowych

Czynniki Nod aktywują komórki kory korzenia do podziałów i tworzenia zawiązka brodawki (*nodule primordium*), który lokalizuje się poniżej miejsca infekcji bakteryjnej i daje początek funkcjonalnej brodawce [62]. Pod względem morfologicznym i anatomicznym wyróżniamy dwa główne typy brodawek: zdeterminowane i niezdeterminowane, różniące się trwałością merystemów, oraz brodawki kołnierzykowate, dzielące własności obydwu typów brodawek [39, 87, 92]. W zależności od gatunku rośliny gospodarza, brodawki powstają w wewnętrznej (brodawki niezdeterminowane) lub zewnętrznej korze korzenia (brodawki zdeterminowane) [73]. Nici infekcyjne rosną w kierunku zawiązka brodawki i po dotarciu do niego uwalniają rizobia w tzw. kropelkach infekcyjnych, w których bakterie przekształcają się w wiążące azot bakteroidy [73]. Struktury powstałe w podobnym do endocytozy procesie, zawierające jeden lub kilka bakteroidów otoczonych błoną peribakteroidalną pochodzenia roślinnego, są nazywane symbiosomami i funkcjonują jako

organelle wiążące azot, zależne od energii i związków węgla dostarczanych przez rośliny [89] [Tabela I].

Brodawki niezdeteminowane charakteryzują się trwałym dystalnym merystemem, którego ciągła aktywność sprawia, że mają one kształt cylindryczny, gradientowe strefy rozwojowe i zawierają heterogenną populację endosymbiontów [2, 28]. Za niezakażoną strefą merystematyczną (strefa I) znajdują się kolejno: II – strefa zakażenia, w której rizobia są uwalniane z nici infekcyjnych do komórek roślinnych; II–III – strefa przejściowa, gdzie komórki roślinne zawierające bakteroidy osiągają ostateczny stopień zróżnicowania; III – strefa, w której dojrzałe symbiosomy aktywnie wiążą azot; strefa IV – w której terminalnie wyróżnione i niewiążące azotu bakteroidy oraz komórki roślinne są degradowane. Wyróżnia się także strefę V – saprofityczną, gdzie obumarłe komórki roślinne są kolonizowane przez pałeczkowate rizobia pochodzące głównie z nici infekcyjnych. Te bakterie wracają do saprofitycznego bytowania w glebie [88, 90, 98].

Brodawki zdeterminowane nie wykształcają trwałego merystemu, mają kształt kulisty i nie wykazują gradientu rozwojowego. Różnicowanie się zainfekowanych komórek gospodarza jest synchroniczne i dojrzałe brodawki zawierają komórki symbiotyczne z homogeną populacją bakteroidów wiążących azot. Bakteroidy nie tracą swojej żywotności i są zdolne do rozmnażania po degradacji brodawki [62]. W obu typach brodawek wzrost i różnicowanie zainfekowanych komórek roślinnych skutkuje wzrostem brodawki. W brodawkach niezdeteminowanych powstają ekstremalnie powiększone komórki symbiotyczne, poliploidalne na skutek powtarzających się cykli endoreduplikacji genomu [85].

Wewnątrz brodawek rizobia ulegają fizjologicznemu i morfologicznemu różnicowaniu w wiążące azot bakteroidy. Wielkość i kształt bakteroidów zależą głównie od rośliny oraz, w pewnym stopniu, od genotypu

rizobiów [62, 65]. W przypadku niektórych gatunków roślin motylkowatych, takich jak koniczyna (*Trifolium* spp.), wyka (*Vicia* spp.) czy lucerna (*Medicago sativa*), zróżnicowanie bakteroidów jest terminalne, co jest spowodowane ekstremalnym zwielokrotnieniem genomu i zahamowaniem podziału bakterii [67]. Możliwość rozwoju następnych wiążących azot bakteroidów oraz populacji glebowej zakażającej kolejne pokolenia roślin zależy od rizobiów zasiedlających brodawkę, zlokalizowanych w niciach infekcyjnych, które nie zostały zróżnicowane do bakteroidów [67, 88]. W gatunkach takich jak groch (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*) czy komonica (*Lotus* sp.), tworzących brodawki zdeterminowane, wielkość, kształt i żywotność bakteroidów jest zbliżona do wolno żyjących rizobiów. Genomy tych komórek symbiotycznych nie są zwielokrotnione i bakterie mogą ulegać normalnym podziałom komórkowym, gdy znajdują się poza brodawką [67, 88] (Tab. I).

Ostatnie badania sugerują, że nieodwracalne różnicowanie bakteroidów jest charakterystyczne tylko dla bobowatych z grupy IRLC (*inverted-repeat-lacking clade*) i nie zależy od typu brodawek [48]. W modelu *Medicago truncatula* wykazano, że ostateczne różnicowanie bakteroidów jest wymuszane przez białka roślinne specyficzne dla brodawek, bogate w cysteinę (NCR, *nodule-specific cysteine-rich peptides*) [39, 90]. W genomie *Medicago truncatula* zidentyfikowano ponad 600 genów dla NCR, które wykazują niewielkie wzajemne podobieństwo sekwencji nukleotydowej, lecz zawsze mają sześć cystein w 160 aminokwasowym peptydzie, N-końcową sekwencję sygnałną potrzebną dla transportu peptydu do symbiosomu oraz wiązanie dwusiarczkowe między cysteinami. Geny dla NCR ulegają ekspresji tylko w czasie symbiozy, a peptydy zostały zidentyfikowane w bakteroidach [39, 61]. NCR mają właściwości podobne do przeciwbakteryjnych defensyn, blokujących podziały komórek bakteryjnych, co

Tabela I
Charakterystyka brodawek korzeniowych tworzonych w symbiozie rizobiów z roślinami bobowatymi

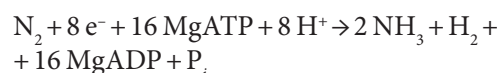
	Brodawki o nietrwałym merystemie (zdeterminowane)	Brodawki o trwałym merystemie (niezdeterminowane)
Rośliny bobowate (Fabaceae)	soja (<i>Glycine max</i>), fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i>), komonica (<i>Lotus japonicus</i>)	lucerna (<i>Medicago sativa</i>), groch (<i>Pisum sativum</i>), koniczyna (<i>Trifolium</i> sp.), wyka (<i>Vicia</i> sp.)
Mikrosymbionty	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>R. phaseoli</i> , <i>R. etli</i> , <i>M. loti</i>	<i>E. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , bv. <i>trifolii</i>
Kształt brodawki	kulisty	cylindryczny/rozgałęziony
Miejsce początkowych podziałów komórkowych	kora zewnętrzna lub środkowa korzenia	kora wewnętrzna
Transport związków N	ureidy	amidy
Bakteroidy	pałeczka wielkości (1–2 μm),	powiększone (5–10 μm), rozgałęzione
Zawartość DNA w komórkach rośliny	1C/2C	poliploid, średnio 24C
Terminalne różnicowanie	nie	tak
Zdolność do rozmnażania	wysoka	niska

jest przyczyną endoreduplikacji genomu i zmiany kształtu bakteroidów. Eksperymenty *in vitro* z izolowanymi NCR potwierdziły ich kluczową rolę w różnicowaniu bakteroidów oraz ich aktywność antybakteryjną [39, 90]. Geny kodujące białka NCR występują również w innych motylkowatych z grupy IRLC, tworzących terminalnie zróżnicowane bakteroidy, natomiast nie wykryto ich w roślinnych gospodarzach, w których nie dochodzi do ostatecznego zróżnicowania bakteroidów [1, 48]. W rizobiach, za transport peptydów NCR kontrolujących różnicowanie i przetrwanie bakteroidów wewnątrz komórek roślinnych, odpowiadają transportery ABC, takie jak białko BacA, które występuje tylko w rizobiach infekujących motylkowate typu IRLC [32, 63]. BacA prawdopodobnie pełni także funkcję ochronną w stosunku do rizobiów redukując antybakteryjne działanie peptydów NCR [39]. Wprawdzie trudno zrozumieć, dlaczego niektóre rośliny bobowate wykształciły mechanizm terminalnego różnicowania wiążących azot bakteroidów, ale stwierdzono, że ten typ bakteroidów bardziej wydajnie wiąże azot niż bakteroidy terminalnie niezróżnicowane [67].

4. Wiązanie azotu

Redukcja azotu cząsteczkowego N_2 do amoniaku jest główną funkcją rizobiów w symbiozie. Bakterie, które ukończyły program różnicowania i zostały zamknięte wewnątrz błony funkcjonalnego symbiosomu, znajdują się w środowisku mikroaerofilnym, w którym zachodzi indukowana ekspresja genów kodujących enzymy kompleksu nitrogenazy, który jest odpowiedzialny za proces wiązania azotu [45]. Środowisko mikroaerofilne jest tworzone w wyniku działania kilku mechanizmów. W komórkach brodawki przepuszczalność błon komórkowych jest kontrolowana przez barierę dyfuzyjną dla tlenu, regulowaną przez wrażliwy na tlen dwuskładnikowy system białek FixJ-FixL, które kontrolują ekspresję NifA, głównego regulatora procesu wiązania azotu [19, 32]. Z kolei dzięki wysokiej ekspresji roślinnych genów dla leghemoglobiny, stanowiącej nawet 25% białek rozpuszczalnych w komórkach brodawki, stężenie O_2 w strefie wiązania azotu utrzymuje się na poziomie od 3 do 22 nM [32, 68]. W ochronie nitrogenazy przed tlenem ważna jest również struktura brodawki, a zwłaszcza warstwa ciasno upakowanych komórek kory stanowiących powierzchnię brodawki, która tworzy barierę dla dyfuzji tlenu i chroni bakteroidy zlokalizowane w strefie centralnej [19].

W procesie wiązania azotu, cząsteczkowy N_2 jest redukowany w wielokrotnych reakcjach transferu elektronów w kompleksie nitrogenazy, w wyniku których powstaje amoniak i jest uwalniany wodór [95]. Bakteryjny kompleks nitrogenazy katalizuje reakcję:



Rizobia zawierają najbardziej powszechną formę nitrogenazy – nitrogenazę molibdenową. Mo-nitrogenaza ma dwie niekorzystne właściwości: duże wymagania energetyczne z minimalną stechiometrią 16 moli ATP na każdą zredukowaną cząsteczkę N_2 oraz bardzo dużą wrażliwość na tlen, która stoi w sprzeczności ze ścisłym tlenowym metabolizmem rizobiów [57]. Kompleks nitrogenazy jest złożony z dwóch głównych funkcjonalnych podjednostek: reduktazy dinitrogenazy NifH (białko Fe, azoferredoksyna) o masie cząsteczkowej ok. 60 kDa oraz dinitrogenazy NifD/NifK, heterotetramerycznego białka (białko Mo-Fe, molibdoferredoksyna) o masie cząsteczkowej ok. 240 kDa [79]. Do ekspresji i aktywności nitrogenazy wymagana jest ponadto obecność kilkunastu białek, kodowanych przez geny *nif* tworzące kilka operonów [19, 57, 99]. Dla porównania, u wolno żyjących diazotrofów *Klebsiella pneumoniae* aktywność nitrogenazy zależy od grupy 20 genów, w *S. meliloti* i *R. leguminosarum* bv. *viciae*, poza strukturalnymi genami kodującymi reduktazę dinitrogenazy (*nifH*) i dinitrogenazę (*nifDK*), do istotnych genów *nif* należą: *nifEN*, *nifB*, kodujące odpowiednio prekursor Fe-S i kofaktor Fe-Mo, oraz regulatorowy gen *nifA* [19, 57]. Dodatkowo, w symbiotyczne wiązanie azotu w rizobiach są zaangażowane geny *fix* (*fixation*), m.in. *fixL*, *fixJ* oraz *fixK*, kodujące dwuskładnikowy system regulatorowy FixL/FixJ oraz regulatorowe białko FixK [4].

Symbiotyczne wiązanie azotu jest mutualistycznym związkiem między bakterią i rośliną [97], w którym wysoka aktywność nitrogenazy utrzymuje się poprzez zapewnienie bakteroidom odpowiedniego stężenia tlenu i stałego źródła energii w formie kwasów dikarboksylowych pochodzących z fotosyntezy [32, 74]. Produktem metabolicznym reakcji katalizowanej przez nitrogenazę jest amoniak, który jest dostarczany roślinie zarówno bezpośrednio przez kanały amonowe w błonie komórek roślinnych, jak i pośrednio, w formie aminokwasów: alaniny, glutaminy i glutaminianu syntetyzowanych przez enzymy bakteryjne. W brodawkach zdeterminowanych duże, zainfekowane bakteriami komórki roślinne sąsiadują z małymi, niezakażonymi komórkami wyspecjalizowanymi w dalszej asymilacji azotu, poprzez konwersję aminokwasów do ureidów, które są eksportowane z brodawki do rośliny [32, 97].

5. Genomy rizobiów

Ryzosfera roślin jest dynamicznym środowiskiem, w którym dystrybucja zasobów zmienia się w czasie i przestrzeni, a korzenie roślin, poprzez wydzielanie różnorodnych związków (aminokwasów, białek, kwasów organicznych, cukrów, witamin, związków aromatycz-

nych i innych metabolitów wtórnych), wywierają silną presję selekcyjną i mają duży wpływ na rozwój i funkcjonowanie mikroorganizmów glebowych [7]. Rizobia, jako bakterie glebowe, muszą być dobrze przystosowane do zmiennego środowiska, gdzie zarówno związki odżywcze, zawartość tlenu, jak i różnorodne czynniki stresowe bezpośrednio wpływają na ich wzrost. Potencjał adaptacyjny rizobiów jest znacznie zwiększony dzięki dużym, wieloczęściowym genomom, typowym również dla innych glebowych α -proteobakterii [22, 46]. Wieloreplikonowa struktura genomu, w którym informacja genetyczna jest podzielona pomiędzy różne replikony, wydaje się być korzystna dla bakterii. Jedną z korzyści wynikających z takiej organizacji genomów może być krótszy czas replikacji całego genomu, co pozwala na utrzymanie większego genomu przy zachowaniu wysokiego tempa podziałów komórkowych [21, 37].

Genomy rizobiów zwykle składają się z jednego dużego chromosomu i różnej liczby plazmidów, których wielkość waha się od kilku kbp do ponad 2 Mbp [3, 30, 34, 35, 77, 100]. Wyjątkiem są wolno rosnące bradyrizobia: np. nie wykryto replikonów pozachromosomalnych w *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, który ma największy spośród zsekwencjonowanych genomów rizobiowych (ok. 9,1 Mbp). Podczas gdy wolno rosnące bradyrizobia nie mają plazmidów, w genomach szybko rosnących rizobiów są one powszechne i mogą stanowić od 30% do niemal 50% wielkości genomu [54, 58]. Genomy blisko spokrewnionych gatunków *R. etli* oraz *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i bv. *viciae* mają podobną organizację i składają się z chromosomu oraz kilku dużych plazmidów [35, 77, 100]. *R. etli* CFN42 ma sześć plazmidów o wielkości od 184 kbp do 643 kbp. *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 ma również sześć plazmidów o wielkości 151 kbp – 870 kbp [100]. Podobną strukturę genomową mają zsekwencjonowane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 oraz WSM2304 [77].

Kompletne sekwencje genomowe rizobiów wykazały, że genomy rizobiów są złożone z elementów rdzeniowych (*core*) i dodatkowych (*accessory*) [14, 41, 51, 100]. Chromosomy stanowią stabilny rdzeń genomu, zawierający głównie geny podstawowego metabolizmu (*housekeeping genes*) niezbędne do funkcjonowania komórki bakteryjnej. Replikony te są konserwowane pod względem zawartości genów (syntenia), a w blisko spokrewnionych gatunkach zachowywany jest również układ genów (kolinearność) [49, 50]. Plazmidy, przeciwnie do chromosomu, są zróżnicowane, zarówno pod względem liczby i wielkości replikonów, jak i zawartości genów w poszczególnych replikonach. Niosą one głównie geny dodatkowe, często nieistotne dla przeżycia komórek, kodujące m.in. systemy transportu oraz liczne szlaki kataboliczne, przyczyniające się do adaptacji bakterii do różnorodnego i zmiennego środowiska glebowego. Plazmidy symbiotyczne są wyposażone

w geny odpowiedzialne za brodawkowanie i wiązanie azotu, lecz nie są istotne dla podstawowego metabolizmu komórek [30, 35, 100].

6. Chromidy i megaplazmidy

Większość genów rdzeniowych istotnych dla przeżycia komórek lokalizuje się w chromosomie, tylko niektóre z nich zidentyfikowano w plazmidach rizobiów. Takie replikony plazmidowe, niezbędne dla wzrostu bakterii i zawierające cechy zarówno plazmidów jak i chromosomów, nazwano chromidami lub „chromosomami dodatkowymi” [41, 51]. Chromidy są często większe od plazmidów współwystępujących w komórce, ale znacznie mniejsze od chromosomu. Uważa się je za elementy genetyczne specyficzne dla rodzaju (mogące wpływać na różnice międzygatunkowe w obrębie rodzaju) i starsze ewolucyjnie niż megaplazmidy. Skład nukleotydowy chromidów, jak również częstość wykorzystywania kodonów (*codon usage*) w zlokalizowanych na nich sekwencjach kodujących są zbliżone do chromosomu, podczas gdy systemy replikacji i partycji są typu plazmidowego [41]. Chromidy wykazują także wysoką zmienność genetyczną, która wynika głównie z małej liczby genów metabolizmu podstawowego zlokalizowanych w tych replikonach [29].

Petersen i wsp. [72] zdefiniowali chromidy, które mogą być wyeliminowane z komórki w warunkach laboratoryjnych, lecz są niezbędne do przeżycia w środowisku naturalnym, jako istotne *sensu lato*. Chromidy, których nie można wyeliminować ze względu na obecność przynajmniej jednego genu z uniwersalnego minimalnego zestawu genów są istotne *sensu stricto*. Podobnie, Dziewit i wsp. [21] sklasyfikowali chromidy bakteryjne do dwóch typów: chromidy główne (podstawowe, *primary*), niezbędne do utrzymania przy życiu gospodarza bakteryjnego, oraz chromidy wtórne (drugorzędne, *secondary*), które są niezbędne wyłącznie w pewnych warunkach środowiskowych i które są prawdopodobnie ewolucyjnie młodsze.

Przykładami chromidów w genomach rizobiów są dwa największe plazmidy *R. leguminosarum* bv. *viciae* – pRL12 i pRL11, o wysokiej zawartości G+C, zbliżonej do chromosomu, zawierające niektóre geny rdzeniowe genomu. Blisko spokrewnione z nimi replikony z niemal identycznymi systemami replikacyjnymi wykryto także w innych zsekwencjonowanych genomach *R. leguminosarum* WSM1325 i WSM2304, *R. etli* CFN42, CIAT 625 i Mim1 [41, 58]. Cechy chromidów mają również mniejsze replikony, takie jak pRL9 oraz p42b [41].

Plazmidy i chromidy α -proteobakterii zwykle zawierają systemy replikacji i partycji typu *repABC* [5, 54, 55, 56, 58]. Systemy replikacyjne typu *repABC* znajdują się także w niektórych chromosomach drugorzędowych

rizobiów i innych bakterii glebowych [29, 72, 100]. Szczególną cechą replikonów *repABC* jest połączenie funkcji replikacji i segregacji w obrębie jednej kasety [14, 58, 59]. W tego typu replikonach wszystkie elementy zaangażowane zarówno w replikację, partycję oraz niezgodność plazmidów występują w obrębie pojedynczej jednostki transkrypcyjnej – operonu *repABC*. Operon *repABC* składa się z trzech genów, ulokowanych zawsze w tej samej kolejności, kodujących białka (RepA, RepB i RepC) oraz genu kodującego mały antysensowny RNA (ctRNA), który jest zlokalizowany w regionie międzygenowym *repB-repC* i transkrybowany w kierunku przeciwnym do kierunku transkrypcji genów *repABC* [94]. Białko RepC jest istotne dla inicjacji replikacji plazmidów [5, 34, 55, 56, 58].

Na megaplazmidach rizobiów zlokalizowane są zwykle geny odpowiedzialne za interakcje symbiotyczne z roślinami motylkowatymi (tzw. plazmidy symbiotyczne – pSym); tylko w niektórych gatunkach geny te tworzą tzw. wyspy symbiotyczne (GI, *genomic island*), lub też są rozproszone w genomie [23, 24, 25, 30]. W *Rhizobium* spp. większość genów symbiotycznych znajduje się w plazmidach, podczas gdy w *Mesorhizobium loti* geny odpowiedzialne za symbiozę tworzą wyspę genomową o wielkości ok. 500 kbp [84]. W *S. fredii* NGR234 operony *nif* i *nod* są zlokalizowane w plazmidzie, zaś geny *fix* w chromosomie [25]. Regiony symbiotyczne genomów bakterii rzędu *Rhizobiales* są strukturami mozaikowatymi, które ulegały częstym rekombinacjom, horyzontalnemu transferowi i transpozycji [8, 14, 25, 59]. Poza pSym, inne części genomów rizobiowych, szczególnie plazmidy niesymbiotyczne, mogą wpływać na wydajność symbiotyczną bakterii, kodując dodatkowe czynniki, takie jak białka i polisacharydy powierzchniowe komórki, które wpływają na konkurencyjność i poziom wiązania azotu [49, 53, 83].

W replikonach pozachromosomalnych rizobiów zidentyfikowano geny zaangażowane w chemotaksję, transport metabolitów, asymilację różnych źródeł węgla, biosyntezę witamin, takich jak biotyna, tiamina czy pantotenu, syntezę bakteriocyn, melaniny, syntezę autoinduktorów *quorum sensing*, systemów modyfikacji-restrykcji oraz białek opiekuńczych [18, 20, 39, 58].

Replikony pozachromosomalne mogą istotnie przyczynić się do kształtowania fenotypu całego gatunku, którego genomy tworzą tzw. pangénom [6, 53]. Koncepcja pangénomu powstała dla zaznaczenia istotności różnic między genomami poszczególnych szczepów, które wspólnie kształtują gatunek [29, 86]. W pangenie można wyróżnić „genom rdzeniowy” obejmujący te geny, które występowały we wszystkich zsekwencjonowanych szczepach danego gatunku oraz „genom dodatkowy” reprezentujący wszystkie pozostałe geny obecne w pewnych, ale nie wszystkich badanych szczepach, a także geny specyficzne dla danego szczepu [6, 72, 86].

Wielkość pangénomu prawdopodobnie odzwierciedla różnice w niszach ekologicznych i stylu życia poszczególnych gatunków [6].

7. Plastyczność genomów rizobiów

Rizobia mogą włączać do swoich genomów dodatkowe elementy genetyczne m.in. w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT, *horizontal gene transfer*), co wpływa zarówno na stabilność ewolucyjną genomu wymaganą do utrzymania podstawowych funkcji komórki, jak i na jego plastyczność potrzebną do szybkiej adaptacji do nowych nisz [23, 25]. Obcy DNA jest pobierany za pośrednictwem plazmidów, fagów lub ruchomych elementów genetycznych, takich jak transpozony, czy wyspy genomowe. Wyspy genomowe są rozpoznawane w genomie ze względu na odmienny skład zasad (zawartość G+C) w porównaniu do genomu gospodarza, jak również odmienną częstość wykorzystywania kodonów [34, 35]. Obecność w genomach DNA pochodzącego z innych bakterii, nazywana mozaikowością genomu, uwidacznia złożoność ich historii ewolucyjnej [35].

Plastyczność i niestabilność genomów rizobiowych wynika ponadto z obecności powtórzonych sekwencji DNA oraz złożonej organizacji genomów. Profile plazmidowe rizobiów są stosunkowo stałe, jednakże mogą zachodzić trudne do obserwacji, częściowe delekcje plazmidów, przypadki rekombinacji i rearanzacji plazmidów, co może z kolei pociągać za sobą zmiany w metabolizmie bakterii [60]. Dowodem znacznej zmienności i rearanzacji plazmidów jest obecność całych kontigów podobnych genów w replikonach plazmidowych w spokrewnionych gatunkach bakterii [49, 50, 53]. Mimo znacznej plastyczności genomów rizobiów, zaobserwowano równocześnie względnie wysoką stabilność regionów symbiotycznych [58].

Zaproponowano kilka hipotez, które próbują uzasadnić zalety występowania wieloreplikonowych genomów: 1) podział genomu może wpływać na skrócenie czasu replikacji i tym samym potencjalnie umożliwiać szybszy wzrost komórek; 2) wieloczęściowe genomy mogą ułatwiać kontrolę tzw. dawki genu i poziomu jego ekspresji; 3) mogą umożliwiać dalszą ekspansję genomu, gdy chromosom osiąga swoją maksymalną wielkość, lokując część materiału genetycznego w plazmidach [17]. Wieloczęściowe genomy umożliwiają podział funkcjonalny genów pomiędzy poszczególne replikony, co jest szczególnie widoczne w bakteriach, które wchodzi w interakcje z organizmem gospodarza [17]. Geny kodujące cechy adaptacyjne znajdują się w genomach bakteryjnych głównie w tzw. strefach plastyczności, które zawierają elementy mobilne i są wysoce zmienne w poszczególnych szczepach. Dzięki fizycznemu oddzieleniu genów

podstawowego metabolizmu (chromosom) od genów zaangażowanych w interakcje z otaczającym środowiskiem (plazmidy), poziom zmian ewolucyjnych genów adaptacyjnych może być zwiększony w istotny sposób, co prawdopodobnie wyjaśnia sukces ewolucyjny wielu gatunków α -proteobakterii [22].

8. Podsumowanie

Symbioza roślin bobowatych z rizobiami, w której bakterie redukują azot atmosferyczny, ma duże znaczenie ekologiczne i rolnicze; pozwala na znaczne zredukowanie ilości nawozów azotowych w uprawach roślin ważnych dla gospodarki i jest przyjazna dla środowiska. W przedstawionym przeglądzie literatury, obok opisu kolejnych etapów rozwoju symbiozy, chcieliśmy zwrócić szczególną uwagę na nowe odkrycia, jakimi są:

- 1) identyfikacja mikrosymbiontów należących do klasy β -proteobakterii wiążących wydajnie azot;
- 2) opisanie rizobiów, które nie wymagają do inicjacji symbiozy czynnika Nod;
- 3) odkrycie dużej klasy roślinnych, bogatych w cysteinę peptydów antybakteryjnych NCR, decydujących o terminalnym zróżnicowaniu bakteroidów tworzonych przez rośliny z grupy IRLC;
- 4) poznanie mechanizmu działania bakteryjnego EPS na inicjację symbiozy poprzez specyficzny receptor typu kinazy LysM. To ostatnie odkrycie stanowi ważną perspektywę dla zrozumienia roli polisacharydów w transmisji sygnałów komórkowych w wielu procesach, nie tylko w bakteriach.

Druga część artykułu dotyczy genetycznych uwarunkowań symbiozy. Genomy rizobiów są duże i zwykle podzielone na kilka replikonów: chromosom i duże plazmidy, w tym plazmidy o cechach chromosomów, nazwane chromidami. Megaplazmidy, dzięki dużemu ładunkowi genetycznemu wpływają znacząco nie tylko na kształtowanie symbiozy, lecz także na cały metabolizm komórki. Ta zróżnicowana architektura genomów rizobiów, zwłaszcza plastyczność plazmidów, przyczyniła się do zwiększenia zdolności adaptacyjnych rizobiów w zmiennym środowisku glebowym, co z kolei pozwoliło na skuteczne konkurowanie z innymi mikroorganizmami. Zwiększone możliwości adaptacyjne rizobiów mogły przypuszczalnie doprowadzić do rozszerzenia swoistości interakcji symbiotycznych z partnerami roślinnymi, co jest korzystne zarówno dla środowiska, jak i dla rolnictwa.

Piśmiennictwo

1. Alunni B., Kevei Z., Redondo-Nieto M., Kondorosi A., Mergaert P., Kondorosi E.: Genomic organization and evolutionary insights on *GRP* and *NCR* genes, two large nodule-specific gene

- families in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**, 1138–1148 (2007)
2. Barnett M.J., Fisher R.F.: Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis*, **42**, 1–24 (2006)
3. Barnett M.J., Long S.R. i wsp.: Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9883–9888 (2001)
4. Barnett M.J., Kahn M.L.: pSymA of *Sinorhizobium meliloti*: nitrogen fixation and more (w) Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms, red. R. Palacios, W.E. Newton, Springer, Dordrecht, 2005, s. 113–132
5. Bartosik D., Baj J., Włodarczyk M.: Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology*, **144**, 3149–3157 (1998)
6. Bentley S.: Sequencing the species pan-genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 258–259 (2009)
7. Bertin C., Yang X., Weston L.A.: The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*. **256**, 67–83 (2003)
8. Black M., Moolhuijzen P., Chapman B., Barrero R., Howieson J., Hungria M., Bellgard M.: The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes*, **3**, 138–166 (2012)
9. Brencic A., Winans S.C.: Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 155–194 (2005)
10. Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X.: Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**, 5641–5652 (2000)
11. Brown C.M., Dilworth M.J.: Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **86**, 39–48 (1975)
12. Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., Boivin-Masson C.: Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* **185**, 7266–7272 (2003)
13. Cooper J.E.: Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1355–1365 (2007)
14. Crossman L.C., González V. i wsp.: A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS One*, **3**, e2567 (2008)
15. D’Haeze W., Holsters M.: Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, **12**, 79R–105R (2002)
16. Denison R.F., Kiers E.T.: Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Curr. Biol.* **21**, R775–785 (2011)
17. diCenzo G.C., MacLean A.M., Milunovic B., Golding G.B., Finan T.M.: Examination of prokaryotic multipartite genome evolution through experimental genome reduction. *PLoS Genet.* **10**, e1004742 (2014)
18. Ding H., Yip C.B., Geddes B.A., Oresnik I.J., Hynes M.F.: Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation. *Microbiology*, **158**, 1369–1378 (2012)
19. Dixon R., Kahn D.: Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 621–631 (2004)
20. Downie J.A.: The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 150–170 (2010)
21. Dziewit L., Czarnecki J., Wibberg D., Radlinska M., Mrozek P., Szymczak M., Schlüter A., Pühler A., Bartosik D.: Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics*, **15**, 124 (2014)

22. Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
23. Finan T.M.: Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* **184**, 2855–2856 (2002)
24. Finan T.M., Pühler A. i wsp.: The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9889–9894 (2001)
25. Flores M., Palacios R. i wsp.: Diversification of DNA sequences in the symbiotic genome of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **187**, 7185–7192 (2005)
26. Frayse N., Couderc F., Poinso V.: Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1365–1380 (2003)
27. Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M.: Rhizobium common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **67**, 504–515 (2008)
28. Gage D.J.: Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280–300 (2004)
29. Galardini M., Biondi E.G. i wsp.: Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics*, **12**, 235 (2011)
30. Galibert F., Batut J. i wsp.: The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293**, 668–672 (2001)
31. Geurts R., Bisseling T.: *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S239–S249 (2002)
32. Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C.: Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 413–441 (2008)
33. Giraud E., Sadowsky M. i wsp.: Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, **316**, 1307–1312 (2007)
34. González V., Dávila G. i wsp.: Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1604–1614 (2010)
35. González V., Dávila G. i wsp.: The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3834–3839 (2006)
36. Gough C., Jacquet C.: Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions. *Trends Plant Sci.* **18**, 566–574 (2013)
37. Guo X., Flores M., Mavingui P., Fuentes S.L., Hernández G., Dávila G., Palacios R.: Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Res.* **13**, 1810–1817 (2003)
38. Gyaneshwar P., James E.K. i wsp.: Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1276–1288 (2011)
39. Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P.: Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 364–383 (2013)
40. Harris J.M., Wais R., Long S.R.: *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 335–341 (2003)
41. Harrison P.W., Lower R.P., Kim N.K., Young J.P.: Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**, 141–148 (2010)
42. Heidstra R., Bisseling T.O.N.: Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* **133**, 25–43 (1996)
43. Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M.: Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil.* **311**, 1–18 (2008)
44. Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M., Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen H., Alves B.J.R., Morrison M.J.: Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **32**, 329–364 (2012)
45. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C.: How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619–633 (2007)
46. Jumas-Bilak E., Michaux-Charachon S., Bourg G., Ramuz M., Allardet-Servent A.: Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 2749–2755 (1998)
47. Kawaharada Y., Stougaard J. i wsp.: Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, **523**, 308–312 (2015)
48. Kereszt A., Mergaert P., Kondorosi E.: Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1300–1309 (2011)
49. Król J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A.: Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*, **89**, 237–247 (2007)
50. Król J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A.: Application of physical and genetic map of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 to comparison of three closely related rhizobial genomes. *Mol. Genet. Genomics*. **279**, 107–121 (2008)
51. Landeta C., Dávalos A., Cevallos M.Á., Geiger O., Brom S., Romero D.: Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J. Bacteriol.* **193**, 1317–1326 (2011)
52. Lee A., Hirsch A.M.: Signals and responses: choreographing the complex interaction between legumes and α - and β -rhizobia. *Plant Signal. Behav.* **1**, 161–168 (2006)
53. López-Guerrero M.G., Ormeño-Orrillo E., Acosta J.L., Mendoza-Vargas A., Rogel M.A., Ramirez M.A., Rosenblueth M., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E.: Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, **68**, 149–158 (2012)
54. Łobocka M., Bugajska O., Dobruk A.: Partycja niskokopijowych plazmidów. *Kosmos*, **51**, 305–318 (2002)
55. MacLellan S.R., Smallbone L.A., Sibley C.D., Finan T.M.: The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of α -proteobacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* **55**, 611–623 (2005)
56. MacLellan S.R., Zaheer R., Sartor A.L., MacLean A.M., Finan T.M.: Identification of a megaplasmid centromere reveals genetic structural diversity within the *repABC* family of basic replicons. *Mol. Microbiol.* **59**, 1559–1575 (2006)
57. Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J.: Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **17**, 458–466 (2009)
58. Mazur A., Koper P.: Rhizobial plasmids – replication, structure and biological role. *Cent. Eur. J. Biol.* **7**, 571–586 (2012)
59. Mazur A., Majewska B., Stasiak G., Wielbo J., Skorupska A.: *repABC*-based replication systems of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 plasmids: incompatibility and evolutionary analyses. *Plasmid*, **66**, 53–66 (2011)
60. Mazur A., Stasiak G., Wielbo J., Kubik-Komar A., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Intragenomic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates. *BMC Microbiol.* **11**, 123 (2011)
61. Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E.: A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* **132**, 161–173 (2003)

62. Mergaert P., Kondorosi E. i wsp.: Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5230–5235 (2006)
63. Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J.: Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **140**, 661–670 (2006)
64. Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C.: Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, **411**, 948–950 (2001)
65. Oke V., Long S.R.: Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 641–646 (1999)
66. Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.: The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 119–144 (2011)
67. Oono R., Anderson C.G., Denison R.F.: Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that reduce fitness of their reproductive clonemates. *Proc. Biol. Sci.* **278**, 2698–2703 (2011)
68. Ott T., van Dongen J.T., Günther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K.: Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* **15**, 531–535 (2005)
69. Peck M.C., Fisher R.F., Long S.R.: Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**, 5417–5427 (2006)
70. Peoples M.B., Jensen E.S. i wsp.: The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, **48**, 1–17 (2009)
71. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J.: Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180–201 (2000)
72. Petersen J., Frank O., Göker M., Pradella S.: Extrachromosomal, extraordinary and essential – the plasmids of the *Roseobacter* clade. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2805–2815 (2013)
73. Popp C., Ott T.: Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 458–467 (2011)
74. Prell J., Poole P.: Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14**, 161–168 (2006)
75. Pueppke S.G., Broughton W.J.: *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 293–318 (1999)
76. Radutoiu S., Stougaard J. i wsp.: Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585–592 (2003)
77. Reeve W., Howieson J. i wsp.: Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Stand. Genomic Sci.* **2**, 347–356 (2010)
78. Relić B., Perret X., Estrada-García M.T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnan H.B., Pueppke S.G., Broughton W.J.: Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* **13**, 171–178 (1994)
79. Rubio L.M., Ludden P.W.: Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**, 405–414 (2005)
80. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J.: Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* **5**, 7 (2006)
81. Skorupska A., Wielbo J., Kidaj D., Marek-Kozaczuk M.: Enhancing *Rhizobium*-legume symbiosis using signaling factors (w) Microbes for Legume Improvement, red. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi, Springer-Verlag, Vienna, 2010, s. 27–54
82. Sprent J.I.: Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* **174**, 11–25 (2007)
83. Stasiak G., Mazur A., Wielbo J., Marczak M., Zebracki K., Koper P., Skorupska A.: Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *J. Appl. Genet.* **55**, 515–527 (2014)
84. Sullivan J.T., Ronson C.W.: Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5145–5149 (1998)
85. Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S.: What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* **60**, 325–389 (2012)
86. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 472–477 (2008)
87. Timmers A.C.: The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J. Microsc.* **231**, 247–256 (2008)
88. Timmers A.C., Soupène E., Auriac M.C., de Billy F., Vasse J., Boistard P., Truchet G.: Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1204–1213 (2000)
89. Udvardi M.K., Day D.A.: Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 493–523 (1997)
90. Van de Velde W., Mergaert P. i wsp.: Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, **327**, 1122–1126 (2010)
91. Vance C.P.: Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* **127**, 390–397 (2001)
92. Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G.: Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**, 4295–4306 (1990)
93. Velázquez E., García-Fraile P., Ramírez-Bahena M.-H., Rivas R., Martínez-Molina E. Bacteria involved in nitrogen-fixing legume symbiosis: current taxonomic perspective (w) Microbes for Legume Improvement, red. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi, Springer-Verlag, Vienna, 2010, s. 1–25
94. Venkova-Canova T., Soberón N.E., Ramírez-Romero M.A., Cevallos M.A.: Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* **54**, 1431–1444 (2004)
95. Weare W.W., Dai X., Byrnes M.J., Chin J.M., Schrock R.R., Müller P.: Catalytic reduction of dinitrogen to ammonia at a single molybdenum center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17099–17106 (2006)
96. Weston L.A., Mathesius U.: Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **39**, 283–297 (2013)
97. White J., Prell J., James E.K., Poole P.: Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* **144**, 604–614 (2007)
98. Wielbo J., Golus J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Symbiosis-stage associated alterations in quorum sensing autoinducer molecules biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Soil.* **329**, 399–410 (2010)
99. Wielbo J., Skorupska A.: Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowe. *Post. Mikrobiol.* **42**, 263–283 (2003)
100. Young J.P., Parkhill J. i wsp.: The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* **7**, R34 (2006)