

# Zróźnicowanie genetyczne populacji rizobiów funkcjonujących w warunkach wysokiej lub niskiej konkurencji międzyszczepowej

Karolina Włodarczyk, Jerzy Wielbo



Katedra Genetyki i Mikrobiologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Wstęp:** Biopreparaty zawierające w swoim składzie żywe komórki rizobiów są od dziesięcioleci używane w uprawie licznych bobowatych. Ich stosowanie ma na celu umożliwienie roślinom nawiązanie wysokoefektywnej symbiozy z bakteriami, których obecność i funkcjonowanie w brodawkach korzeniowych dostarcza roślinnemu gospodarzowi związków azotu niezbędnych do wzrostu i wydajnego plonowania.

Brodawki korzeniowe powstają w trakcie wieloetapowego procesu odbywającego się z udziałem mikrosymbiontów i ich roślinnego gospodarza. Obejmuje on między innymi powstanie nowych merystemów w korzeniach, kolonizację tkanek roślinnych przez rizobia oraz rozwój wyspecjalizowanych struktur składających się na dojrzałą brodawkę korzeniową, w której odbywa się redukcja azotu cząsteczkowego. W trakcie tego procesu o miejsce w rozwijających się brodawkach mogą rywalizować liczne szczepy obecne w ryzosferze – zarówno symbionty, jak i niesymbiotyczne endofity.

Cechy rizobiów takie jak zdolność do wydajnej redukcji azotu cząsteczkowego oraz zdolność do kolonizacji brodawek korzeniowych nie są ze sobą skorelowane. Mimo że wysoka wydajność bakteryjnej redukcji azotu atmosferycznego jest korzystna dla roślin, symbiotyczne rizobia kolonizujące brodawki, podobnie jak szczepy obecne w ryzosferze, w większości wykazują przeciętną lub niską wartość tej cechy. Z tego powodu w uprawie roślin bobowatych często stosuje się biopreparaty zawierające wyselekcjonowane szczepy zdolne do wysokowydajnej redukcji azotu cząsteczkowego – także w przypadku prowadzenia upraw na glebach zawierających rizobia. Większość polskich gleb jest zasiedlona przez zróżnicowane populacje rizobiów o wysokiej liczebności, dlatego można przyjąć, że główną przyczyną często obserwowanego braku pozytywnego efektu inokulacji roślin przy pomocy zastosowanego biopreparatu jest niezdolność wprowadzonego szczepu do kolonizacji brodawek, spowodowana jego niską konkurencyjnością w stosunku do szczepów autochtonicznych.

Prowadzone od lat badania nad cechami związanymi z wykształceniem wysokich zdolności konkurencyjnych rizobiów na razie nie pozwalają na jednoznaczne wskazanie tych, które przesądzą o sukcesie szczepu w procesie kolonizacji brodawek korzeniowych. Wskazuje się między innymi na zdolność do chemotaktycznej reakcji na wydzieliny korzeniowe roślin, zdolność do wykorzystania określonych związków jako źródeł węgla, azotu i energii, zdolność do syntezy sygnałów molekularnych działających na rośliny czy powiązania z bakteryjnym systemem *quorum sensing*, jednak brak kompleksowych badań dostarczających danych na temat wkładu tych cech w wykształcenie obserwowanego poziomu konkurencyjności szczepu. Poznanie istotności poszczególnych składowych wpływających na zdolności kompetycyjne rizobiów byłoby bardzo pomocne w procesie izolacji i selekcji szczepów przeznaczonych do produkcji biopreparatów stymulujących wzrost roślin bobowatych, ponieważ mogłoby wskazać genetyczne determinanty cech, które (oprócz wysokiej wydajności redukcji azotu cząsteczkowego) powinny posiadać takie szczepy, a to minimalizowałoby ryzyko produkcji biopreparatów na bazie szczepów wysokowydajnych lecz o niskiej konkurencyjności.

**Cel pracy:** Celem pracy było określenie zróżnicowania i podobieństwa genetycznego szczepów należących do 4 populacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Rizobia wszystkich czterech populacji pochodziły z tego samego środowiska glebowego, jednak były izolowane różnymi metodami, dzięki czemu uzyskano dwie populacje izolowane w warunkach wysokiej konkurencji (izolaty z brodawek, które zasiedliły nieliczne szczepy z dużej grupy obecnych w ryzosferze – po etapie intensywnej konkurencji międzyszczepowej w trakcie kolonizacji tkanek roślinnych), oraz dwie populacje izolowane w warunkach braku konkurencji: pochodzącą wprost z gleby, oraz pochodzącą z brodawek korzeniowych, których zasiedlenie nie wiązało się z konkurencją międzyszczepową (niewielka liczba komórek podanych do ryzosfery roślin umożliwiała zasiedlenie brodawek wszystkim szczepem, które weszły w kontakt z roślinami).

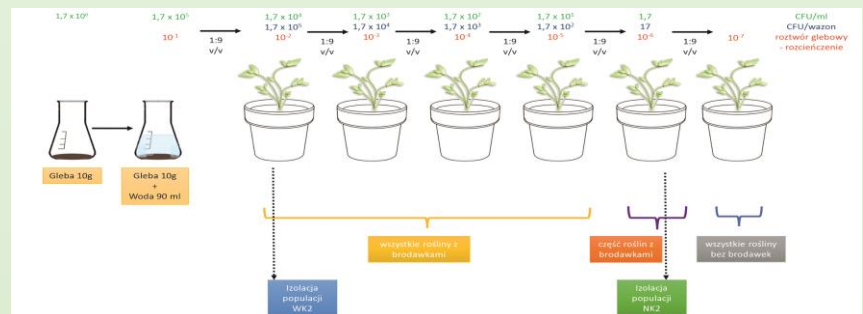
**Materiały i metody:** Rizobia wykorzystane w badaniach pochodziły z gleby ugorowanej, w której liczebność *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* oznaczono metodą biotestu MPN (ang. *most probable number*) wynosiła  $1,7 \times 10^6$  komórek/g gleby. Ogółem zbadano 77 szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* należących do 4 populacji: WK1 (18 szczepów), WK2 (19 szczepów), NK1 (20 szczepów) i NK2 (20 szczepów) (Tab. 1).

Populację WK1 izolowano z brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*) rosnącej na w.w. glebie, natomiast populację NK1 izolowano z wodnego wyciągu otrzymanego z tej gleby. Populacje WK2 oraz NK2 izolowane były z brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej użytej w bioteście MPN oszacowującym liczbę *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w glebie – z roślin, u których kolonizacja brodawek przebiegała w warunkach wysokiej konkurencji (WK2) lub przy jej braku (NK2) (Rys. 1).

Z czystych kultur badanych izolatów izolowano całkowite DNA, a następnie przeprowadzono reakcję BOX-PCR z zastosowaniem startera BOX1AR (5'-CtCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3') i warunków amplifikacji: wstępna denaturacja – 3 min, 95°C; denaturacja – 1 min, 94°C; przyłączanie startera – 1 min, 53°C; wydłużanie produktu – 8 min, 65 °C; końcowe wydłużanie – 4 min, 65 °C; liczba cykli: 35. Uzyskane amplikony były rozdzielane elektroforetycznie w żelu agarozowym (1,5%), w buforze TBE, przy 140V przez 1,5 godz. Otrzymane profile amplifikacyjne analizowano przy użyciu programu BioD1++, a dendrogram opisujących podobieństwo genetyczne badanych szczepów wykonano z wykorzystaniem metody UPGMA.

Populacja	Szczepy	Charakterystyka populacji
WK1	BRC2, BRC3, BRC4, BRC5, BRC6, BRC8, BRC9, BRC10, BRC11, BRC12, BRC13, BRC14, BRC15, BRC16, BRC17, BRC18, BRC19, BRC20	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny rosnącej na niesterylnej glebie zawierającej około $1,7 \times 10^6$ komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> / g gleby; wysoki poziom konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
WK2	AA1, AA2, AA4, AA5, BB1, BB2, BB3, BB5, BB6, CC1, CC3, CC4, CC5, DD1, DD2, DD3, DD6, DD7, DD8	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny glebowym zawierającym około $1,7 \times 10^6$ komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> / ml; wysoki poziom konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
NK1	GLA2, GLA4, GLA5, GLA7, GLA8, GLA9, GLA11, GLA12, GLA14, GLA15, GLA17, GLA18, GLA19, GLA21, GLA23, GLA24, GLA25, GLA26, GLA28, GLA29	Szczepy izolowane z wyciągu glebowego zawierającego około $1,7 \times 10^6$ komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ; brak konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
NK2	A1, A2, A3, A4, A5, B3, B4, B6, B7, C1, C3, C4, C5, C6, C7, D1, D2, D3, D4, D5	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny rosnącej na sterylnym piasku, zakażone wyciągiem glebowym zawierającym około 2 komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> / ml; brak (bardzo niski poziom?) konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych

Tab1. Charakterystyka badanych szczepów



Rys.1 Schemat biotestu MPN opisujący pochodzenie populacji WK2 i NK2

Grupa	Populacja				RAZEM grupa
	WK1	WK2	NK1	NK2	
Grupa 1	3	1	1	8	13 (100%)
	(31%)	(59%)			
Grupa 2a	9	8	3	3	23 (100%)
	(74%)	(26%)			
Grupa 2b	6	10	16	9	41 (100%)
	(39%)	(61%)			

Tab2. Udział szczepów należących do badanych 4 populacji w grupach (kładach) dendrogramu

Grupa	Populacja				RAZEM populacja
	WK1	WK2	NK1	NK2	
Grupa 1	3 (17%)	1 (5%)	1 (5%)	8 (40%)	
Grupa 2a	9 (50%)	8 (42%)	3 (15%)	3 (15%)	
Grupa 2b	6 (33%)	10 (53%)	16 (80%)	9 (45%)	
RAZEM populacja	18 (100%)	19 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	

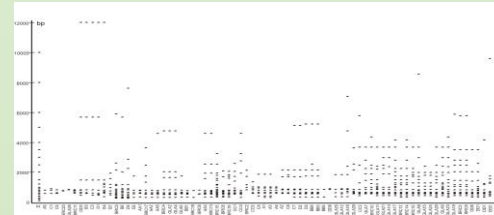
Tab3. Udział szczepów pochodzących z populacji o różnym nasileniu konkurencji międzyszczepowej w poszczególnych grupach (kładach) dendrogramu

**Wyniki:** W wyniku amplifikacji metodą BOX-PCR uzyskano produkty o wielkości od ok. 260 pz do ok. 12000 pz; w zależności od szczepu otrzymywano od 2 do 16 amplikonów (Rys. 2). Analiza porównawcza profili restrykcyjnych pozwoliła na stworzenie dendrogramu przedstawiającego podobieństwo genetyczne profili BOX-PCR badanych izolatów, dzięki któremu można podzielić badane szczepy na 3 grupy: Grupę 1, Grupę 2a oraz Grupę 2b (Rys. 3).

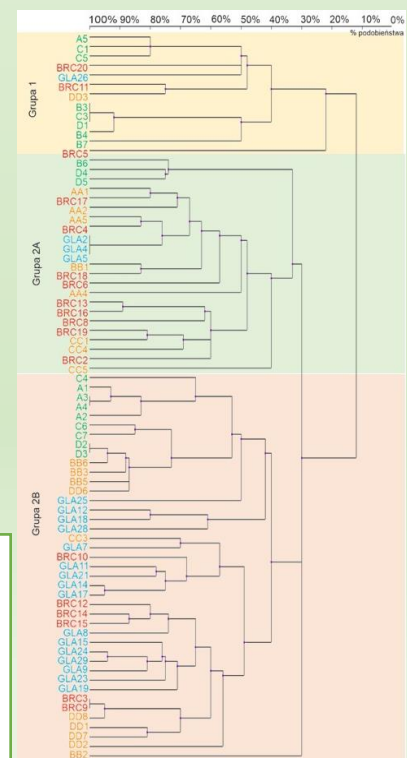
Widoczne na dendrogramie grupowanie szczepów nie pozwala na dokładne rozdzielenie szczepów należących do różnych populacji, jednak można zauważyć pewne zależności: 50% szczepów populacji WK1 zostało zgrupowanych w kładzie „Grupa 2a”, a 80% szczepów populacji NK1 – w kładzie „Grupa 2b”. Z kolei tylko 1 szczep do populacji WK2 znalazł się w Grupie 1, i tylko 3 szczepy należące do populacji NK2 – w Grupie 2a (Tab. 2).

Biorąc pod uwagę klasyfikację badanych populacji jako „pozyskane ze środowiska po etapie intensywnej konkurencji międzyszczepowej w trakcie zakażenia gospodarza” (WK1, WK2) można zauważyć znaczną dysproporcję dotyczącą grupowania szczepów: 74% szczepów stanowiących kład „Grupa 2a” to szczepy z populacji „z konkurencją” (WK1 i WK2), natomiast 69% szczepów kładu „Grupa 1” oraz 61% „Grupa 2b” to szczepy z populacją „bez konkurencji” (NK1 i NK2) (Tab.3).

**Podsumowanie:** Zastosowana technika badania zróżnicowania genetycznego badanych izolatów (BOX-PCR) nie wykorzystuje markerów genetycznych związanych z właściwościami kompetycyjnymi rizobiów wyrażającymi się podczas kolonizacji brodawek roślinnego gospodarza, pozwalając jedynie na przybliżone oszacowanie podobieństwa porównywanych genomów. Jednak otrzymany wynik lokujący większość szczepów populacji „z konkurencją” w grupach innych niż większość szczepów populacji „bez konkurencji” pozwala na przypuszczenie, że genomy szczepów „konkurencyjnych” różnią się od „niekonkurencyjnych” – być może wskutek obecności określonych genów/sekwencji/regionów genetycznych. Możliwe, że sekwencjonowanie oraz wykonanie analizy porównawczej sekwencji całych genomów szczepów należących do tych populacji pozwoliłoby na wskazanie tych genów/sekwencji/regionów genetycznych związanych z konkurencyjnością. Takie dane byłby cenną wskazówką możliwą do wykorzystania w procesie selekcji szczepów wysokowydajnych w redukcji azotu cząsteczkowego – i zarazem wysokokonkurencyjnych w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych roślinnego gospodarza.



Rys. 2 Profile BOX-PCR uzyskane dla badanych szczepów



Rys. 3 Genetyczne podobieństwo badanych szczepów oszacowane z zastosowaniem metody BOX-PCR