

dr Jerzy Wielbo
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

AUTOREFERAT

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe / artystyczne

- magister: „Aktywność transkrypcyjna regionu DNA kontrolującego syntezę egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1” – praca magisterska; Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 1997;
- doktor: „Zastosowanie genu reporterowego *gusA* do znakowania szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* i badania ekspresji genów” – rozprawa doktorska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 2004.

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Początki pracy w zespole badawczym

Pracę w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Annę Skorupską rozpocząłem w roku 1995 jako student IV roku kierunku Biotechnologia, prowadzonego na UMCS w Lublinie. W latach 1996-1997 otrzymywałem stypendium Ministra Edukacji Narodowej za bardzo dobre wyniki w nauce. Badania wykonane przez mnie w ramach pracowni magisterskiej polegały na klonowaniu wybranych genów *Rhizobium leguminosarum* i badaniu ich warunków ekspresji *in vitro*. Badania te zostały opisane w pracy magisterskiej pt. „Aktywność transkrypcyjna regionu DNA kontrolującego syntezę egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1”, którą obroniłem w czerwcu 1997 roku z wynikiem bardzo dobrym.

Od uzyskania tytułu magistra do doktoratu

Po uzyskaniu tytułu magistra kontynuowałem pracę w zespole prof. dr hab. Anny Skorupskiej – najpierw jako uczestnik studiów doktoranckich UMCS (październik 1997 – marzec 1998 r.), a następnie (od marca 1998 r.) jako asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (wcześniejsza nazwa obecnego Zakładu Genetyki i Mikrobiologii UMCS).

Prowadzone przeze mnie prace wpisywały się w działalność badawczą zespołu i koncentrowały się wokół problemów związanych z genetyczną kontrolą syntezy egzopolisacharydów *Rhizobium leguminosarum* oraz roli tych związków w procesie wymiany sygnałów i rozwoju symbiozy pomiędzy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a koniczyną (*Trifolium*).

Brałem udział w zespołowych badaniach nad:

- a) genetycznym podłożem syntezy egzopolisacharydu (EPS) *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, których rezultatem było zidentyfikowanie i określenie potencjalnej funkcji kilkunastu nie opisanych wcześniej genów, nazwanych *pss* lub *prs*;
- b) czynnikami wpływającymi na poziom ekspresji genów *pss* i *prs* w komórkach rizobiów saprofitycznych (wolnożyjących), jak również w rizobiach w układzie symbiotycznym (*in planta*);
- c) wpływem mutacji w genach *pss* na rozwój układu symbiotycznego *R. leguminosarum* bv. *trifolii* – koniczyna, w których wykazano niezbędność rizobiowych egzopolisacharydów dla prawidłowego rozwoju brodawkowania roślin i wiązania N₂.

Opisane badania finansowane były m.in. z grantu pt. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów *pss* kontrolujących biosyntezę kwaśnego egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” (6 P04A 05818, lata 2000-2003) kierowanego przez prof. dr hab. Annę Skorupską, w którym byłem jednym z wykonawców. Przeprowadzone badania opisano w kilku publikacjach których byłem współautorem:

1. Mazur A., **Wielbo J.**, Król J., Kopcińska J., Łotocka B., Golinowski W., Skorupska A., 1998, „Molecular characterization and symbiotic importance of *prsD* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1”, *Acta Biochim. Polon.*, 45: 1067-1073;

2. Król J., **Wielbo J.**, Mazur A., Kopcińska J., Łotocka B., Golinowski W., Skorupska A., 1998, "Molecular characterization of *pssCDE* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1: *pssD* mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria", *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11: 1142-1148;
3. Janczarek M., Król J., Kutkowska J., Mazur A., **Wielbo J.**, Borucki W., Kopcińska J., Łotocka B., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A., 2001, "Mutation in *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability", *J. Plant Physiol.* 158: 1565-1574;
4. Mazur A., Król J., **Wielbo J.**, Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A., 2002, "*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization", *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15: 388-397;
5. **Wielbo J.**, Mazur A., Król J., Marczak M., Skorupska A., 2004, "Environmental modulation of the *pssTNOP* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*", *Can. J. Microbiol.*, 50, 201-211;
6. **Wielbo J.**, Mazur A., Król J., Marczak M., Kutkowska J., Skorupska A., 2004, "Complexity of phenotypes and symbiotic behavior of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* exopolysaccharide mutants", *Arch. Microbiol.*, 182: 331-336.

Publikacje te zostały nagrodzone: nagrodą zespołową II^o Rektora UMCS (Lublin 1998), nagrodą zespołową Polskiego Towarzystwa Genetycznego (Poznań 2001) oraz nagrodą zespołową Komitetu Organizacyjnego Krajowego Kongresu Biotechnologii (Łódź 2003).

Innym problemem, na którym skupiały się w tym czasie moje badania, było zastosowanie genów markerowych w badaniach interakcji rizobiów i ich roślinnych gospodarzy. Byłem kierownikiem grantu „Konstrukcja nowych kaset i wektorów zawierających geny markerowe (*gusA*, *celB*) przeznaczonych do znakowania i mutagenyzy bakterii” (2 P04A 03426, lata 2000-2001), w ramach którego powstały liczne konstrukty zawierające gen kodujący β-glukuronidazę - białko markerowe pozwalające na wizualizację mikroorganizmów w środowisku ich życia. W oparciu o plazmidy o szerokim zakresie gospodarza skonstruowałem szereg wektorów, w których gen *gusA* ulegał ekspresji konstytutywnej, przeznaczonych do znakowania i wykrywania obecności bakterii, oraz kasety z genem *gusA* bez własnego promotora, przeznaczone do badania warunków aktywności transkrypcyjnej genów. Konstrukty te opisano w pracy:

Wielbo J., Skorupska A., 2001, „Construction of improved vectors and cassettes containing *gusA* and antibiotic resistance genes for studies of transcriptional activity and bacterial localization” J. Microbiol. Methods, 45: 197-205.

Były one używane w badaniach własnych opublikowanych w pracach Mazur i wsp., 2002, Mol. Plant Microbe Interact. 15: 388-397, 2002 oraz Wielbo i wsp., 2004, Can. J. Microbiol. 50, 201-211 i Arch. Microbiol. 182: 331-336, jak również przez inne zespoły naukowe.

Badania wykonane w latach 1998-2004 złożyły się na moją pracę doktorską pt. „Zastosowanie genu reporterowego *gusA* do znakowania szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* i badania ekspresji genów”. Dzięki zastosowaniu konstruktów z genem β -glukuronidazy wykazałem, że ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* zachodzi także w brodawkach korzeniowych koniczyny, podlegając tam takim samym mechanizmom regulacyjnym jak podczas wegetatywnego wzrostu bakterii. Ponadto wykazano, że produkowany w brodawkach korzeniowych egzopolisacharyd pozwala rizobiom na uniknięcie reakcji obronnych zakażonych roślin, dzięki czemu możliwy jest prawidłowy rozwój brodawek korzeniowych i rozwój efektywnej symbiozy. Pracę doktorską obroniłem 04.06.2004.

Osiągnięcie naukowe realizujące art. 16 ust. 2 ustawy o stopniach naukowych

TYTUŁ:

Struktura genetyczna populacji *Rhizobium leguminosarum* oraz czynniki konkurencji w populacjach rizobiowych

PUBLIKACJE

wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego

(12 prac eksperymentalnych i 1 praca przeglądowa):

1. Marek-Kozaczuk M., **Wielbo J.**, Dobrowolski R., Skorupska A. (2006). Wpływ poziomu azotu w glebie na wielkość populacji szczepów *Rhizobium* i ich zdolności do symbiotycznego wiązania azotu. **Zesz. Nauk. Uniw. Przyrodn. we Wrocławiu**, nr 546/2006 seria Rolnictwo LXXXI IX, 249-258.
2. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2006). Zróżnicowanie profilów plazmidowych oraz wydajność symbiotyczna szczepów *Rhizobium leguminosarum* izolowanych z roślin motylkowatych rosnących na użytkowych rolniczo glebach Lubelszczyzny. **Zesz. Nauk. Uniw. Przyrodn. we Wrocławiu**, nr 546/2006 seria Rolnictwo LXXXI IX, 367-376.
3. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Kubik-Komar A, Skorupska A. (2007). Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. **Can. J. Microbiol.**, 53: 957-967.
4. Maj D., **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Martyniuk S., Skorupska A. (2009). Pretreatment of clover seeds with Nod factors improves growth and nodulation of *Trifolium pratense*. **J. Chem. Ecol.**, 35:479-87.
5. **Wielbo J.**, Golus J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2010). Symbiosis stage-associated alterations in quorum sensing autoinducer molecules biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. **Plant Soil**, 329: 399-410.

6. Maj D., **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. **Microbiol. Res.**, 165: 50-60.
7. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Mazur A., Kubik-Komar A., Skorupska A. (2010). Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76: 4593-4600.
8. **Wielbo J.**, Kuske J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2010). The competition between *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains progresses until late stages of symbiosis. **Plant Soil**, 337: 125-135.
9. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Kidaj D., Skorupska A. (2011). Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains in mixed inoculation of clover (*Trifolium pratense*). **Pol. J. Microbiol.**, 60: 43-49.
10. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Mazur A., Kubik-Komar A., Skorupska A. (2011). The structure and metabolic diversity of population of pea microsymbionts isolated from root nodules. **Br. Microbiol. Res. J.** 1: 55-69.
11. Kidaj D., **Wielbo J.**, Skorupska A. (2012). Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. **Microbiol. Res.**, 167: 144-150.
12. **Wielbo J.**, Kidaj D., Koper P., Kubik-Komar A., Skorupska A. (2012). The effect of biotic and physical factors on the competitive ability of *Rhizobium leguminosarum*. **Centr. Eur. J. Biol.**, 7: 13-24.
13. **Wielbo J.** (2012). Rhizobial communities in symbiosis with legumes: genetic diversity, competition and interactions with host plants. **Centr. Eur. J. Biol.**, 7: 363-372.

Łączny *impact factor* w.w. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 18,967

Suma punktów za w.w. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW 246 pkt

WPROWADZENIE – przedmiot badań

Proces biologicznego wiązania azotu jest w ekosystemach naturalnych jedyną drogą, jaką azot atmosferyczny może zostać wprowadzony do puli glebowych związków azotowych dostępnych dla roślin. Najwydajniejsze w biologicznym wiązaniu azotu są układy symbiotyczne tworzone przez rizobia i rośliny motylkowate (*Fabaceae*) wiążące 200-400 kgN/ha/rok. Ilość azotu pozyskiwana przez rośliny dzięki biologicznej redukcji N₂ jest porównywalna z globalną ilością syntetycznych nawozów azotowych produkowanych przez człowieka.

Rizobia to diazotrofy należące do rodzajów *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* i *Phyllobacterium* (α -*Proteobacteria*) oraz *Burkholderia* i *Cupriavidus* (β -*Proteobacteria*). Ich wspólnymi cechami są: (a) obecność funkcjonalnego kompleksu enzymatycznego nitrogenazy redukującej N₂ do NH₃ oraz (b) posiadanie genów *nod* odpowiedzialnych za syntezę chitolipooligosacharydowych morfogenów (tzw. czynników Nod) indukujących powstawanie brodawek na korzeniach roślinnego gospodarza.

Geny *nod* pełnią bardzo istotną rolę w określeniu swoistości symbiozy, która polega na tym, że określone gatunki lub biotypy rizobiów są mikrosymbiontami konkretnych rodzajów lub gatunków roślinnych gospodarzy, np. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* jest symbiontem koniczyny (*Trifolium* spp.), a *Sinorhizobium meliloti* – lucerny (*Medicago* spp.), nostrzyka (*Melilotus* spp.) i kozieradki (*Trigonella* spp.). Wśród genów *nod* wyróżnia się tzw. geny wspólne *nod* (*common nod genes*), których produkty są odpowiedzialne za syntezę oligosacharydowych rdzeni czynników Nod, posiadających podobną budowę u wszystkich rizobiów oraz tzw. geny specyficzności gospodarza (*hsn nod genes, host specificity of nodulation*), których produkty odpowiadają za dołączanie do rdzenia różnorodnych podstawników. Enzymy kodowane przez geny *hsn nod* są odpowiedzialne za powstanie ostatecznej struktury rizobiowych czynników Nod, a to z kolei przesądza, jakie gatunki roślin motylkowatych są wrażliwe na te sygnały.

Proces nawiązywania symbiozy jest precyzyjnie regulowany i wymaga licznych cząstek sygnałnych, takich jak roślinne flawonoidy czy bakteryjne czynniki Nod i ezopolisacharydy. Rozwój symbiozy pomiędzy mikrosymbiontem a roślinnym gospodarzem obejmuje wiele etapów: rozpoznanie partnerów, infekcję tkanek korzenia rośliny, powstanie brodawek korzeniowych i zasiedlenie brodawek. W brodawkach dochodzi do endocytozy rizobiów przez komórki roślinne, jednak komórki bakteryjne pozostają odrębnymi

elementami. Są one otoczone błoną peribakteroidalną i ulegają przekształceniu w bakteroidy redukujące N_2 do NH_3 . Energię niezbędną do tego procesu rizobia uzyskują z węglowodanów dostarczanych przez rośliny, same natomiast przekazują komórkom roślinnym zredukowane związki azotu - amidy lub ureidy.

Genomy rizobiów są duże i często (np. u *Rhizobium* czy *Sinorhizobium*) mogą być podzielone na kilka replikonów - chromosom oraz plazmidy. Replikon, zawierający region genetyczny umożliwiający rizobiom nawiązanie symbiozy z roślinami motylkowatymi, obejmujący geny *nod* oraz geny kodujące kompleks enzymatyczny nitrogezy i współdziałających z nią białek (tzw. geny *nif* i *fix*), jest nazywany plazmidem symbiotycznym. U rizobiów nie posiadających plazmidów (np. *Bradyrhizobium* czy *Mesorhizobium*) region *nod-nif-fix* jest położony na chromosomie i stanowi tzw. wyspę symbiotyczną. Genomy rizobiów charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną spowodowaną mutacjami, rekombinacjami pomiędzy poszczególnymi replikonami oraz międzyszczepowym, koniugacyjnym transferem plazmidów. Przyjmuje się, że znaczny rozmiar genomów i ich zmienność umożliwiają rizobiom dostosowanie się do różnych środowisk – glebowego, w którym rizobia funkcjonują jako saprofity, oraz środowiska wewnątrz tkanek i komórek roślinnych, gdzie występują zarówno jako saprofity, jak i endosymbiotyczne bakteroidy.

Czynniki środowiskowe wpływając na zmienność genomów powodują powstawanie komórek o nowych genotypach, które dają początek nowym szczepom i gatunkom. Biorąc pod uwagę dużą liczebność rizobiów w glebach można przypuszczać, że lokalne populacje *Rhizobium* złożone są z licznych blisko spokrewnionych szczepów, różniących się od siebie (genetycznie i fizjologicznie) i konkurujących ze sobą w trakcie cyklicznych pasażów w kolejno zajmowanych środowiskach. Za cykl takich pasażów uważać można: namnażanie w glebie – kolonizację roślin – zasiedlanie brodawek korzeniowych – namnażanie w brodawkach – uwalnianie do gleby – namnażanie w glebie... itd.

Badania nad rizobiami dotyczą czynników warunkujących rozwój symbiozy, genetycznego i fizjologicznego zróżnicowania populacji czy zależności filogenetycznych pomiędzy jednostkami systematycznymi. Poszukuje się też odpowiedzi na pytanie jakie cechy fizjologiczne szczepów korzystnie wpływają na ich zdolności konkurencyjne w stosunku do szczepów dzielących z nimi wspólne środowisko czyli ryzosferę korzeni.

Przedstawione dalej badania, wykonane przeze mnie po uzyskaniu stopnia doktora, były próbą odpowiedzi na następujące pytania:

- a) Czy genetyczne i fizjologiczne zróżnicowanie szczepów jest powszechne w populacjach rizobiowych?
- b) Jaki jest poziom wewnątrzpopulacyjnego zróżnicowania genetycznego – jak wiele różniących się od siebie szczepów można zidentyfikować w obrębie jednej populacji, lub w brodawkach pojedynczej rośliny?
- c) Jaki jest stopień zróżnicowania metabolicznego w obrębie populacji, i czy takie zróżnicowanie metaboliczne ma wpływ na konkurencyjność szczepów?
- d) Jakie jest znaczenie poszczególnych cech fizjologicznych rizobiów w kształtowaniu właściwości konkurencyjnych szczepów?
- e) Czy można zwiększyć konkurencyjność szczepów rizobiowych poprzez ingerencję w system wymiany sygnałów molekularnych funkcjonujący pomiędzy bakteriami lub pomiędzy rośliną a jej mikrosymbiontami?

OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

Badania nad zróżnicowaniem populacji rizobiów rozpocząłem realizując granty badawcze Prorektora UMCS ds. Nauki:

- „Selekcja szczepów rizobiowych wysokowydajnych w redukcji azotu atmosferycznego przeznaczonych do produkcji szczepionek zwiększających plonowanie roślin motylkowatych” (rok 2004, kierownik: prof. dr. hab. Anna Skorupska, J. Wielbo - wykonawca),
- „Badanie zdolności kompetycyjnych wyselekcjonowanych szczepów rizobiowych przeznaczonych do produkcji szczepionek zwiększających plonowanie roślin motylkowatych” (rok 2005, kierownik: prof. dr. hab. Anna Skorupska, J. Wielbo – wykonawca), oraz
- „Analiza organizacji genomu wyselekcjonowanych szczepów rizobiowych przeznaczonych do produkcji szczepionek zwiększających plonowanie roślin motylkowatych” (rok 2005, kierownik: J. Wielbo).

W trakcie przeprowadzonych badań zebrano kolekcję około 200 szczepów należących do rodzajów *Rhizobium*, *Sinorhizobium* i *Bradyrhizobium*, pochodzących z uprawnych gleb

Lubelszczyzny. Stwierdzono, że każda z gleb zasiedlana była przez więcej niż jeden szczep należący do danego rodzaju rizobiów, oraz że szczepy te różniły się od siebie zarówno pod względem organizacji materiału genetycznego - posiadały różne profile plazmidowe, jak i pod względem cech istotnych z ekologicznego lub agronomicznego punktu widzenia - różniły się zdolnością do brodawkowania roślinnego gospodarza oraz charakteryzowała je różna wydajność symbiotycznego wiązania azotu. Obserwacje te opisano w pracach:

1. Marek-Kozaczuk M., **Wielbo J.**, Dobrowolski R., Skorupska A., 2006, „Wpływ poziomu azotu w glebie na wielkość populacji szczepów *Rhizobium* i ich zdolności do symbiotycznego wiązania azotu”, Zesz. Nauk. Uniw. Przyrodn. we Wrocławiu nr 546/2006 seria Rolnictwo LXXXI IX, 249-258, oraz
2. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2006, „Zróżnicowanie profili plazmidowych oraz wydajność symbiotyczna szczepów *Rhizobium leguminosarum* izolowanych z roślin motylkowatych rosnących na użytkowych rolniczo glebach Lubelszczyzny”, Zesz. Nauk. Uniw. Przyrodn. we Wrocławiu nr 546/2006 seria Rolnictwo LXXXI IX, 367-376.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że występowanie mieszanych i zróżnicowanych genetycznie populacji rizobiowych jest zjawiskiem powszechnym. Jednakże zastosowany sposób zbierania materiału do badań, polegający na izolacji rizobiów z losowo wybranej i niewielkiej liczby brodawek korzeniowych roślin danego gatunku, rosnących na określonym stanowisku glebowym, nie pozwala na dokładne określenie stopnia zróżnicowania populacji wybranego gatunku/biotypu rizobiów. W związku z tym, w dalszych badaniach zawężono „terytorialny” i „gatunkowy” zakres doświadczeń, ograniczając je do modelowych populacji *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz *R. leguminosarum* bv. *viciae* – zakażających odpowiednio koniczynę i groch. Dzięki temu zwiększono dokładność analiz polegających na izolacji rizobiów z wszystkich brodawek powstałych na korzeniach wybranej, małej grupy roślin (ponad 130 izolatów z brodawek koniczyny i ponad 250 izolatów z brodawek grochu). Ponadto pogłębiono charakterystykę szczepów, która objęła m.in. oznaczenie licznych cech genetycznych (profil plazmidowy, sekwencja chromosomowego regionu 16-23S rDNA, sekwencja plazmidowego regionu symbiotycznego *nodA-nodF*), metabolicznych (profil metaboliczny, wzrost na podłożach syntetycznych lub zawierających komponenty naturalne takie jak wyciąg glebowy) oraz symbiotycznych (wydajność brodawkowania roślinnego gospodarza oraz symbiotycznego wiązania azotu).

Stwierdzono, że obie modelowe populacje były wewnętrznie bardzo zróżnicowane, szczególnie pod względem organizacji materiału genetycznego, czyli ilości replikonów składających się na genom, który stanowił chromosom i kilka plazmidów. Analiza sekwencji regionów 16-23S rDNA oraz *nodA-nodF* wykazała, że w obrębie każdej populacji wyróżnić można sub-populacje (klady), często o charakterystycznym profilu metabolicznym (np. preferencyjnie wykorzystujące cukry lub kwasy organiczne). Sugeruje to, że populacje złożone są ze szczepów należących do różnych linii ewolucyjnych współistniejących w obrębie danego biotypu.

W obu populacjach przeważały liczebnie szczepy o relatywnie niskiej wydajności symbiotycznej. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że pojedyncze rośliny koniczyny lub grochu zasiedlane były zwykle przez kilka/kilkanaście różnych szczepów rizobiów, wydaje się, że ostateczny efekt wspomagania wzrostu gospodarza jest pozytywny i nie stanowi to istotnego ograniczenia dla wzrostu rośliny. Wyniki opublikowano w pracach:

3. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Mazur A., Kubik-Komar A., Skorupska A., 2010, "Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules", Appl. Environ. Microbiol. 76: 4593-4600, oraz
4. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Mazur A., Kubik-Komar A., Skorupska A., 2011, "The structure and metabolic diversity of population of pea microsymbionts isolated from root nodules", Br. Microbiol. Res. J. 1: 55-69.

Równoległe do analizy zróżnicowania populacji rizobiów, prowadzono badania nad czynnikami wpływającymi na konkurencyjność szczepów. Celem tych badań była identyfikacja szczepów *R. leguminosarum* efektywnych w symbiotycznym wiązaniu azotu i jednocześnie zdolnych do wydajnej kolonizacji brodawek korzeniowych. Podejmowano też próby zwiększenia konkurencyjności szczepów o wysokiej wydajności, co mogłoby zostać wykorzystane w procesie produkcji bionawozów zawierających żywe komórki rizobiów.

Konkurencja międzyszczepowa jest konsekwencją zarówno genetycznego jak i fizjologicznego zróżnicowania lokalnych populacji rizobiów. Można ją zaobserwować w przypadku szczepów konkurujących o zasoby pokarmowe w środowisku glebowym lub współzawodniczących ze sobą w procesie kolonizacji korzeni roślin. Środowisko glebowe nie jest jednak jedynym miejscem, w którym działają mechanizmy konkurencji międzyszczepowej.

Badania przeprowadzone przeze mnie na *Sinorhizobium meliloti* oraz *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* znakowanych genami markerowymi *gusA* i *gfp* (*green fluorescent protein*) wykazały, że w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych znaleźć można nie tylko rizobia inicjujące infekcję komórek brodawki lub komórki bakteryjne przekształcone w redukujące N₂ bakteroidy, ale także (szczególnie w najstarszych częściach brodawek) bardzo liczne komórki rizobiów saprofitycznych, posiadających cechy charakterystyczne dla rizobiów bytujących w glebie. Taką cechą jest synteza sygnałnych laktonów homoserynowych (*AHLs*, *acylated homoserine lactones*) zaangażowanych w procesy koordynowane poprzez zjawisko *quorum sensing*. Ponadto zaobserwowano, że namnażanie poszczególnych szczepów rizobiów zasiedlających brodawki korzeniowe jest skorelowane raczej z ich obecnością w strefie zajmowanej przez rizobia saprofityczne (strefa starzenia brodawki) niż ze stopniem kolonizacji całych brodawek lub ich strefy symbiotycznej.

Można zatem przypuszczać, że zjawisko kompetycji międzyszczepowej występuje u rizobiów w sposób ciągły. Rizobia glebowe konkurują o przetrwanie w glebie lub możliwość wniknięcia do korzeni roślinnych a następnie do brodawek. Natomiast bakterie, które dotrą do rozwijających się brodawek, współzawodniczą o niszę w saprofitycznej strefie brodawek, gdzie mogą się namnażać przed uwolnieniem i ponownym znalezieniem się w środowisku glebowym. Obserwacje te przedstawiono w publikacjach:

5. **Wielbo J.**, Golus J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2010, "Symbiosis stage-associated alterations in quorum sensing autoinducer molecules biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*", *Plant Soil*, 329: 399-410, oraz
6. **Wielbo J.**, Kuske J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2010, "The competition between *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains progresses until late stages of symbiosis", *Plant Soil*, 337: 125-135.

Konkurencja międzyszczepowa zachodząca w tkankach roślinnych jest prawdopodobnie zjawiskiem powszechnym. W trakcie przeprowadzanych doświadczeń często obserwowano współzakazanie brodawek przez dwa lub trzy różne szczepy rizobiów, a brodawki zasiedlone przez pojedyncze szczepy stanowiły czasem mniej niż połowę badanych brodawek. Obserwacje te opisano w pracy:

7. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Kidaj D., Skorupska A., 2011, „Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains in mixed inoculation of clover (*Trifolium pratense*)”, *Pol. J. Microbiol.*, 60: 43-49.

W połączeniu z przedstawionymi wcześniej badaniami, dotyczącymi struktury lokalnych populacji wybranych biotypów *R. leguminosarum*, wyniki te ilustrują złożoność układu symbiotycznego *Rhizobium* - roślina motylkowata, w którym pojedyncze rośliny motylkowate nawiązują relacje z licznymi, wąsko wyspecjalizowanymi lecz jednocześnie bardzo zróżnicowanymi szczepami bakteryjnego endosymbionta.

W trakcie prac nad identyfikacją tych fizjologicznych cech rizobiów, które są istotne w konkurencji szczepów w populacjach glebowych, wykazano, że istotną rolę mogą odgrywać zarówno czynniki związane z metabolizmem rizobiów, jak i z procesem wymiany sygnałów molekularnych pomiędzy mikrosymbiontami a ich gospodarzem. Zaobserwowano, że szeroki profil metaboliczny rizobiów, czyli zdolność do wykorzystania dużej liczby różnorodnych substratów, w tym głównie kwasów organicznych i aminokwasów, jest pozytywnie skorelowany z konkurencyjnością szczepów, co przedstawiono w pracy:

8. **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Kubik-Komar A, Skorupska A., 2007, „Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness”, *Can. J. Microbiol.*, 53: 957-967.

Ponadto opisano związek pomiędzy zdolnością do reakcji rizobiów na flawonoidy (roślinne sygnały symbiotyczne) a konkurencyjnością szczepów. Większość szczepów efektywnie zasiedlających brodawki korzeniowe w warunkach konkurencyjnych charakteryzowała się wysokim poziomem aktywności transkrypcyjnej genów odpowiedzialnych za brodawkowanie (*common nod*) w odpowiedzi na stymulację flawonoidami. Wyniki przedstawiono w publikacji:

9. **Maj D.**, Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2010, „Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*”, *Microbiol. Res.*, 165: 50-60.

Nie wszystkie związki sygnałowe, uczestniczące w procesie nawiązywania symbiozy, wpływają korzystnie na konkurencyjność szczepów lub mogą powodować istotne zmiany struktury populacji rizobiów zasiedlających brodawki korzeniowe. Doświadczenia zebrane w pracach:

10. Maj D., **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Martyniuk S., Skorupska A., 2009, “Pretreatment of clover seeds with Nod factors improves growth and nodulation of *Trifolium pratense*”, *J. Chem. Ecol.*, 35:479-87, oraz

11. Kidaj D., **Wielbo J.**, Skorupska A., 2012, “Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions”, *Microbiol. Res.*, 167: 144-150

pokazują, że działanie rizobiowymi czynnikami Nod na układy symbiotyczne, takie jak *R. leguminosarum* bv. *trifolii* – koniczyna lub *R. leguminosarum* bv. *viciae* – groch, nie zwiększa w istotny sposób konkurencyjności szczepów użytych do inokulacji roślin.

Zaobserwowano, że potencjał metaboliczny rizobiów czy poziom reakcji na sygnały roślinne mogą mieć odmienne znaczenie na różnych etapach symbiozy. Zdolność do indukcji flawonoidami roślinnymi ma większe znaczenie na etapie kolonizowania korzeni przez rizobia glebowe, natomiast potencjał metaboliczny bakterii może odgrywać istotną rolę, nie tylko w konkurencji w glebie, ale także w tkankach roślinnych (np. podczas namnażania mikrosymbiontów w brodawkach). Możliwe, że na konkurencyjność szczepów wpływają też inne cechy, np. zdolność do syntezy AHL działających w systemie *quorum sensing*, jednak ich znaczenie jest raczej drugorzędne. Ponadto stwierdzono, że istotny wpływ na właściwości konkurencyjne szczepów rizobiowych mają czynniki środowiskowe, takie jak liczebność populacji autochtonicznych (glebowych) rizobiów. Wydaje się natomiast, że konkurencyjność wyselekcjonowanych wysokowydajnych szczepów rizobiów nie może zostać zwiększona przy pomocy sygnałów molekularnych uczestniczących w symbiozie (flawonoidy, czynniki Nod) lub komunikacji między bakteriami (laktony homoserynowe), co opisano w pracy:

12. **Wielbo J.**, Kidaj D., Koper P., Kubik-Komar A., Skorupska A., 2012, „The effect of biotic and physical factors on the competitive ability of *Rhizobium leguminosarum*”, *Centr. Eur. J. Biol.*, 7: 13-24.

Opisane publikacje, stanowiące główny nurt badań pt. „Struktura genetyczna populacji *Rhizobium leguminosarum* i czynniki konkurencji w populacjach rizobiowych”, zostały dwukrotnie nagrodzone nagrodą zespołową I° Rektora UMCS (rok 2010 i 2011) oraz nagrodą III° Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Genetycznego (rok 2011).

Znaczną część przedstawionych wyżej badań wykonano w ramach grantów:

- „Badanie mechanizmów aktywacji bakterii symbiotycznych w celu zastosowania ich jako szczepionek w uprawie roślin motylkowatych” (PBZ-KBN-112/P06/2005, lata 2005–2008, kierownik: prof. dr hab. Anna Skorupska, J. Wielbo – wykonawca);

- „Genetyczne i fizjologiczne zróżnicowanie populacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: rola wybranych cech fizjologicznych mikrosymbiontów w kształtowaniu ich własności kompetycyjnych oraz adaptacji do zasiedlania brodawek korzeniowych grochu” (NN304026734, lata 2008-2011, kierownik: dr Jerzy Wielbo);
- „Genetyczne uwarunkowania adaptacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do endosymbiotycznego i glebowego środowiska” (NN301028734, lata 2008-2011, kierownik: dr Andrzej Mazur, J. Wielbo – wykonawca).

Najważniejsze wyniki badań, związane z opisanym powyżej głównym nurtem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 12 oryginalnych prac eksperymentalnych to:

- wykazanie znaczącego zróżnicowania genetycznego i metabolicznego populacji rizobiów;
- zademonstrowanie złożoności układu symbiotycznego (jedna roślina – wiele różniących się szczepów rizobiów);
- wykazanie działania konkurencji międzyszczepowej w tkankach roślinnych;
- zidentyfikowanie czynników wpływających na konkurencyjność rizobiów oraz określenie ich istotności.

Wyniki własne przedyskutowano z opublikowanymi przez badaczy z innych ośrodków w artykule przeglądowym:

13. **Wielbo J.**, 2012, „Rhizobial communities in symbiosis with legumes: genetic diversity, competition and interactions with host plants” - *Centr. Eur. J. Biol.* 7: 363-372

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Wykorzystanie bakteryjnych czynników Nod w zwiększeniu wydajności symbiozy w układach rizobia – rośliny motylkowate

W trakcie badań nad populacjami rizobiów oraz konkurencyjnością szczepów nie udało się wyselekcjonować takich szczepów, które byłyby zarówno wysoko konkurencyjne w stosunku do autochtonicznych populacji glebowych, jak również charakteryzowałyby się wysoką wydajnością symbiotycznego wiązania azotu, dzięki czemu mogłyby posłużyć jako materiał do produkcji nowych bionawozów dla roślin motylkowatych.

Podjęto więc badania nad produkcją i zastosowaniem czynników Nod, izolowanych z hodowli rizobiów, jako czynnika stymulującego wzrost roślin motylkowatych. Dowiedziono, że preparaty czynników Nod, izolowane z hodowli szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz *R. leguminosarum* bv. *viciae* pochodzących z własnych kolekcji, zastosowane do zaprawiania nasion koniczyny, wyki i grochu, zwiększają procent kiełkowania nasion, przyspieszają ukorzenianie siewek, a w późniejszym okresie zwiększają liczbę brodawek korzeniowych, co korzystnie wpływa na zwiększenie wzrostu i plonowania roślin. Preparaty takie, pozbawione żywych komórek rizobiów, wymagają współdziałania autochtonicznych populacji rizobiowych żyjących w glebie, co może być uważane za ich wadę.

Jednak biorąc pod uwagę powszechność gatunków rizobiów w polskich glebach, oraz wysoką liczebność bakterii w populacjach można przyjąć, że strategia zastosowania preparatów z czynników Nod, powodujących zwiększenie brodawkowania roślin i zasiedlenia tych brodawek przez rizobia autochtoniczne, jest bardziej racjonalna niż wzbogacanie o jeszcze jeden szczep dobrze zaadaptowanych populacji glebowych złożonych z bardzo różnorodnych szczepów. Taki szczep, pomimo potencjalnie wysokiej wydajności, nie jest wystarczająco konkurencyjny, aby wpłynąć na wzrost inokulowanych roślin. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazujących na pozytywny efekt stosowania preparatów czynników Nod w uprawie roślin motylkowatych opisano w publikacjach:

1. Maj D., **Wielbo J.**, Marek-Kozaczuk M., Martyniuk S., Skorupska A., 2009, "Pretreatment of clover seeds with Nod factors improves growth and nodulation of *Trifolium pratense*", J. Chem. Ecol., 35:479-87, oraz

2. Kidaj D., **Wielbo J.**, Skorupska A., 2012, "Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions", *Microbiol. Res.*, 167: 144-150.

Z uwagi na możliwość praktycznego zastosowania opisanych biopreparatów, do Urzędu Patentowego RP złożono zgłoszenia patentowe:

1. **Wielbo J.**, Maj D., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2009, „Nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KO17 oraz bionawóz na bazie metabolitów tego szczepu stymulujący kiełkowanie i wzrost roślin motylkowatych i sposób otrzymywania bionawozu stymulującego kiełkowanie i wzrost roślin motylkowatych”, zgłoszenie nr P388372 (patent udzielony decyzją z dnia 07.03.2012), oraz
2. **Wielbo J.**, Maj D., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2010, „Nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 do zastosowania w otrzymywaniu bionawozu dla roślin motylkowatych oraz sposób wytwarzania tego bionawozu”, zgłoszenie nr P391304 (wniosek w trakcie rozpatrywania).

Badania nad stosowaniem preparatów czynników Nod w uprawie roślin motylkowatych w warunkach polowych są obecnie kontynuowane w ramach grantów:

1. NN310307539: „Wpływ flawonoidów, czynników Nod oraz ściółkowania na brodawkowanie i plonowanie grochu”, jednostka realizująca: Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie, kierownik: dr Anna Siczek, J. Wielbo – wykonawca od 2011 r.;
2. NN310731540: „Poszukiwanie możliwości zwiększenia efektywności symbiotycznego wiązania azotu przez groch siewny w wyniku stosowania czynników Nod”, jednostka realizująca: Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, kierownik: prof. dr hab. Janusz Podleśny, J. Wielbo – wykonawca od 2011 r.;
3. Program „Iuventus Plus” MNiSW: „Wpływ rizobiowych czynników Nod na strukturę populacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* zasiedlających brodawki korzeniowe grochu siewnego (*Pisum sativum*)”, jednostka realizująca: UMCS Lublin, kierownik: mgr Dominika Kidaj, J. Wielbo – wykonawca od 2012 r.

Wymienione projekty badawcze mają na celu zbadanie wpływu preparatów czynników Nod na plonowanie grochu w różnych układach glebowo-roślinnych oraz w połączeniu z różnymi praktykami agrotechnicznymi oraz ocenę ekologicznych skutków stosowania takich preparatów.

Organizacja genomów szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Brałem udział w pracach nad strukturą genetyczną i systemami replikacyjnymi plazmidów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Badanie te wykazały, że pomimo dużego zróżnicowania liczby i wielkości replikonów plazmidowych, występujących w szczepach populacji *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, można zaobserwować zarówno duże podobieństwo sekwencji regionów odpowiedzialnych za replikację i niezgodność plazmidów, jak również podobny rozkład markerów genetycznych w poszczególnych replikonach badanych rizobiów. Można zatem założyć, że genomy poszczególnych szczepów, pomimo różnic dotyczących struktury i wielkości, wykazują duże genetyczne podobieństwo. Szczegółowe analizy sekwencji wybranych genów pochodzących z różnych replikonów sugerują, że poszczególne regiony genomu rizobiów ewoluują w różnym tempie, zależnym od kompartmentu genomowego. Badania te opisano w pracach:

1. Mazur A., Majewska B., Stasiak G., **Wielbo J.**, Skorupska A., 2011, „*repABC*-based replication systems of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 plasmids: incompatibility and evolutionary analyses”, *Plasmid*, 66: 53-66, oraz
2. Mazur A., Stasiak G., **Wielbo J.**, Kubik-Komar A., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A., 2011, “Intragenomic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates”, *BMC Microbiol.*, 11: 123.

Wpływ czynników środowiskowych na produkcję egzopolisacharydu *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Wyniki przedstawione w publikacji:

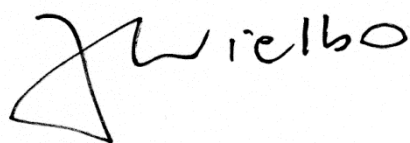
1. Wielbo J., Skorupska A., 2008, “Influence of phosphate and ammonia on the growth, exopolysaccharide production and symbiosis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 with clover (*Trifolium pratense*)”, *Acta Biol. Hung.*, 59: 115-127

stanowiły końcowy etap badań nad produkcją egzopolisacharydu *R. leguminosarum*. Wykazano, że synteza egzopolisacharydu zmienia się zarówno w odpowiedzi na różne stężenie jonów fosforanowych jak i amonowych, co może mieć duże znaczenie ekologiczne, biorąc pod uwagę niezbędność egzopolisacharydu w rozwoju symbiozy.

Plany na przyszłość

W najbliższej przyszłości chciałbym kontynuować zarówno naukowy, jak i aplikacyjny wątek prowadzonych badań. Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS dysponuje obecnie nowoczesnym zestawem aparatury do masywnego sekwencjonowania DNA (Solid™ zakupiony w Programie Rozwoju Polski Wschodniej 2007-2013), dzięki któremu możliwe będzie prowadzenie analiz genetycznych na poziomie całych genomów. Chciałbym uczestniczyć w planowanych badaniach nad genomiką mikroorganizmów i ich populacji.

Jednocześnie, wspólnie ze współpracownikami z IUNG-PIB w Puławach, planuję kontynuowanie ulepszania formuły i testowania bionawozów zawierających rizobiowe czynniki Nod oraz pracę nad komercjalizacją wyników tych badań.

Handwritten signature in black ink, consisting of a stylized initial 'J' followed by the name 'Wielbo'.