

Streszczenie

Biologiczne wiązanie azotu jest procesem, w którym N_2 jest redukowany jest do amoniaku przez organizmy prokariotyczne i w tej formie wprowadzany jest do biosfery i metabolizowany w komórkach żywych organizmów. Główną rolę w tym procesie pełnią bakterie brodawkowe powszechnie zwane ryzobiami, które w symbiotycznej interakcji z roślinami bobowatymi asymilują od 30 do 50% N_2 wiązanego przez wszystkie organizmy diazotroficzne. Mutualistyczna interakcja ryzobiów z roślinami bobowatymi jest ważna dla rolnictwa i korzystna dla środowiska, stąd ogromne zainteresowanie tym procesem oraz bakteriami brodawkowymi (mikrosymbiontami) i ich partnerami roślinnymi (makrosymbiontami).

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była wielokierunkowa charakterystyka mikrosymbiontów określenie dziko rosnącej rośliny bobowatej *Lembotropis nigricans* (szczodrzyk czerniejący), polegająca na określeniu stopnia ich zróżnicowania fenotypowego, polimorfizmu genomowego oraz ustalenie ich pozycji taksonomicznej na poziomie rodzaju i gatunku. Jak również ustalenie ich pokrewieństwa filogenetycznego z innymi bakteriami w oparciu o ich geny rdzeniowe i geny *nod* oraz efektywności wiązania azotu atmosferycznego. Bakterie te nie były dotychczas opisane w literaturze naukowej.

W pierwszym etapie scharakteryzowano badane mikrosymbionty pod względem cech fenotypowych. Analiza numeryczna tych cech wykazała, że izolaty z brodawek korzeniowych *L. nigricans* są fenotypowo najbardziej podobne do bakterii rodzaju *Bradyrhizobium*.

Polimorfizm genomowy badanych ryzobiów, określono trzema metodami „genomowego odcisku palca” tj.: BOX-PCR, ERIC-PCR i AFLP, co łącznie z analizą wzorów restrykcyjnych 16S rDNA uzyskanych techniką RFLP – 16S rDNA pozwoliło wyselekcjonować szczepy (reprezentujące różne grupy genomowe) do analizy sekwencji 16S rDNA, genów rdzeniowych i symbiotycznych.

Pozycja taksonomiczna symbiontów szczodrzyka czerniejącego na poziomie rodzaju i ich pokrewieństwo filogenetyczne z innymi bakteriami zostało określone w oparciu o analizę sekwencji genu kodującego 16S rRNA. Tak ustalona przynależność badanych ryzobiów do rodzaju została zweryfikowana analizą sekwencji czterech genów metabolizmu podstawowego (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoB*). Uzyskane dane

potwierdziły wyniki analizy numerycznej cech fenotypowych i wykazały, że badane mikrosymbionty należą do rodzaju *Bradyrhizobium*.

Zastosowanie techniki MLSA, tj. wielolokusowej analizy połączonych sekwencji genów metabolizmu podstawowego potwierdziło przynależność izolatów brodawek korzeniowych szczodrzyka czerniejącego do rodzaju *Bradyrhizobium* i umożliwiło określenie afiliacji symbiontów *L. nigricans* do gatunku *Bradyrhizobium japonicum*, co zostało również potwierdzone stopniem hybrydyzacji ich DNA na poziomie 77,5 – 83,3%. W badaniu ewolucji organizmów ryzobiów specyficznych dla szczodrzyka czerniejącego wykorzystano także geny symbiotyczne, tj. *nodC* i *nodZ*. Ważnym zadaniem niniejszej pracy była analiza akresu gospodarza badanych szczepów i efektywności wiązania N₂ w symbiozie z naturalnym gospodarzem, tj. szczodrzykiem czerniejącym oraz innymi roślinami plemienia Genisteeae (pomiar suchej masy części nadziemnej i test acetylenowy).

Wielokierunkowe badania dotyczące nieopisanych symbiontów szczodrzyka czerniejącego dotyczące ich różnorodności fenotypowej i genomowej oraz pokrewieństwa filogenetycznego z innymi bakteriami w oparciu o analizę sekwencji genów rdzeniowych i symbiotycznych, jak i określenie stopnia hybrydyzacji DNA tych bakterii z DNA referencyjnych ryzobiów, pozwoliły zaklasyfikować te bakterie do rodzaju, gatunku, a także symbiowaru, tj. do taksonu *Bradyrhizobium japonicum* symbiowar *genistearum*.