

Niewidoczni sprzymierzeńcy symbiozy: potencjał metaboliczny i funkcjonalny endofitów nierizobiowych (NRE) izolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny



UMCS
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Magdalena Wójcik, Kamil Żebracki, Piotr Koper, Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur

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

Wprowadzenie i cel pracy

Biologiczne wiązanie azotu (BNF) jest kluczowym procesem obiegu azotu w przyrodzie. Bakterie zwane rizobiami wchodzą w symbiozę z roślinami bobowatymi tworząc na ich korzeniach brodawki, w których wiążą azot atmosferyczny i uniezależniają rośliny od nawożenia azotowego oraz wprowadzają do gleby ogromne ilości tego pierwiastka. Obecnie wiadomo, że w brodawkach występują także inne mikroorganizmy, tzw. NRE (*Non-Rhizobial Endophytes*), które mogą wspomagać ogólny „fitness” roślin. Rola NRE w symbiozie wciąż nie została w pełni poznana.

Celem pracy było **profilowanie metaboliczne i charakterystyka fenotypowa NRE** wyizolowanych z brodawek koniczyny białej i czerwonej.

Wyniki i wnioski

Z brodawek korzeniowych koniczyny białej (KB) i koniczyny łąkowej (czerwonej) (KC) wyizolowano bakterie pod kątem selekcji mikroorganizmów typu NRE. Łącznie uzyskano **17 szczepów**, których morfologia i kinetyka wzrostu istotnie różniła się względem rizobiów. Wstępna klasyfikacja taksonomiczna izolatów oparta na analizie **sekwencji fragmentu genu 16S rRNA** pozwoliła na ich przyporządkowanie do rodzajów *Bacillus*, *Actinomyces*, *Priestia*, *Peribacillus*, *Roseomonas*, *Microbacterium* Fig. 1.

Brak amplifikacji fragmentów rizobiowych genów *gyrB*, *atpD*, *recA* w szczególności *nodA* (gen związany z procesem brodawkowania u rizobiów) oraz **brak brodawek korzeniowych w testach roślinnych (Fig. 4)** potwierdziły, że badane szczepy **nie indukują bezpośrednio procesu symbiozy**, a sekwencja ich genomów jest znacząco odmienna od bakterii z rodzaju *Rhizobium*, co stanowiło **potwierdzenie ich przynależności do grupy NRE**.

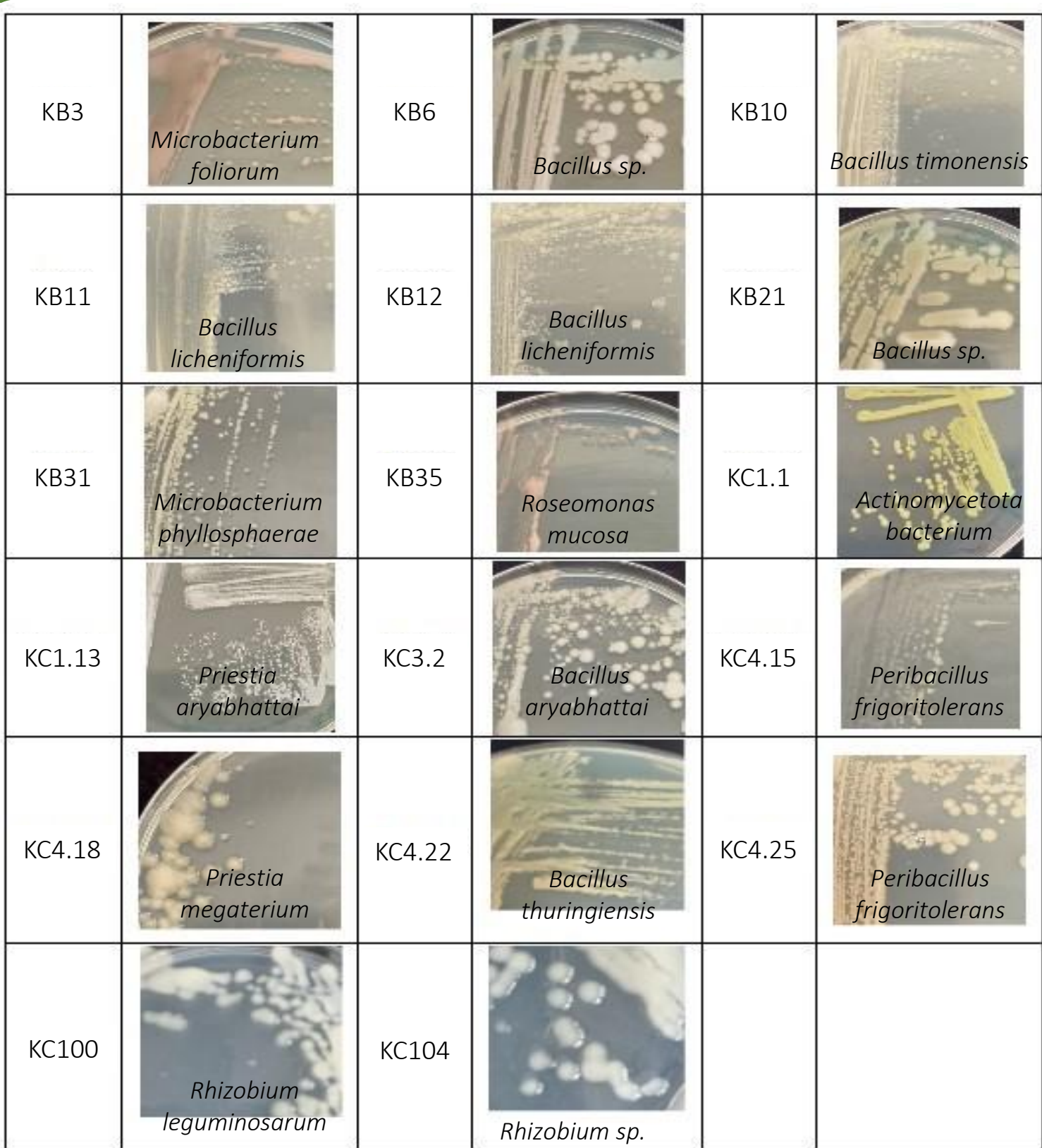


Fig. 1. Morfologia kolonii izolatów NRE wyizolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej (KB) i czerwonej (KC) oraz ich przynależność gatunkowa ustalana na podstawie podobieństwa sekwencji DNA fragmentu genu 16S rRNA (Algorytm BlastN)

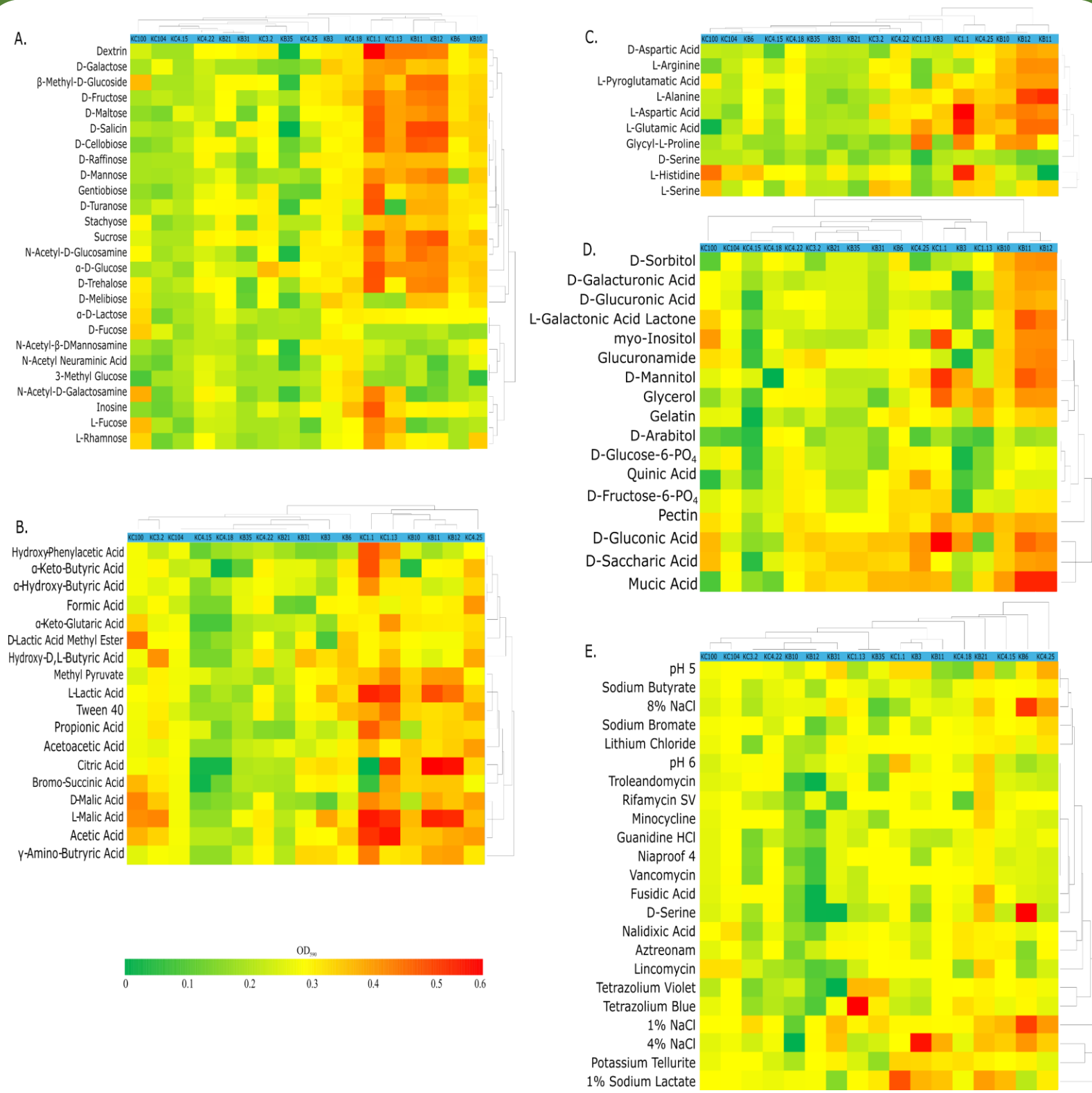


Fig. 2. Mapy ciepła skonstruowane na podstawie zdolności do wykorzystania 71 substratów, jako źródła węgla (A) - węglowodanów i ich pochodnych, (B) - kwasów organicznych i ich pochodnych, (C) - aminokwasów, (D) - alkoholi wielowodorotlenowych i kwasów uronowych oraz wrażliwość na 23 stresory chemiczne (E) z użyciem mikromacierzy Biolog GENIII. Wyniki zostały przedstawione, jako dane pomiaru absorpcji 590 nm (im wyższy poziom tym wyższa aktywność metaboliczna (ABCD) lub wyższy poziom tolerancji względem substancji stresowej (E))

Szczepy z grupy KB także miały szerokie spektrum zdolności metabolicznych. Profil wykorzystania substratów przez izolaty KB10, KB11 był zbliżony do efektywnych metabolicznie szczepów z grupy KC. Ponadto szczepy KB3 i KB6 najlepiej spośród badanych izolatów tolerowały obecność stresorów (np. NaCl).

W ramach profilowania fenotypowego wszystkie izolaty NRE przebadano również pod kątem zdolności do syntezy enzymów i fitohormonów oraz **zwiększenia przyswajalności fosforanów**. Szczepy **KC1.1, KC1.13, KC3.2, KC4.15, KC4.18, KC4.25, KB10, KB21 oraz KB31 wykazywały aktywność proteolityczną a szczepy KC1.1, KC1.13, KC3.2, KC4.25, KB21 oraz KB31 zwiększały przyswajalność fosforanów. Ponadto szczepy KB21, KB10 oraz w mniejszym stopniu KC1.13 i KC3.2 wykazywały zdolność do produkcji indolu Fig. 3.** Wszystkie z badanych szczepów wykazywały aktywność deaminazy ACC.

Wykonano również szklarniowy test roślinny, polegający na inokulacji siewek koniczyny w następujących układach: a) koinokulacja szczepem kontrolnym *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (symbiont koniczyny) oraz każdym z izolatów NRE oraz b) zakażenie jedynie izolatami NRE Fig. 4. Uzyskane wyniki potwierdziły, że **badane szczepy NRE samodzielnie nie indukują powstawania brodawek na korzeniach roślin, jednak są znajdowane w brodawkach tworzonych na koniczynie przez szczep symbiotyczny w układzie koinokulacji.** W przypadku szczepów KB6, KB21, KB31 zaobserwowano znacznie bardziej rozbudowaną strefę korzeniową w porównaniu do roślin kontrolnych.

Wyniki testów fenotypowych nie tylko potwierdzają zdolność NRE do kolonizacji brodawek korzeniowych w sposób zależny od bakterii symbiotycznych, wskazują również, że ze względu na duży potencjał metaboliczny ich obecność w brodawkach może wpływać na podniesienie wydajności samej symbiozy oraz efektywności wzrostu i kondycji rośliny.

Kolejny etap obejmował profilowanie metaboliczne izolatów NRE z użyciem płytek BiOLOG GEN III MicroPlates Fig.2. Badano wykorzystanie 71 źródeł węgla oraz wrażliwość szczepów na 23 czynniki chemiczne. Analiza danych BiOLOG wykazała, że badane izolaty wykazują zróżnicowane zdolności metaboliczne. W grupie izolatów KC największy potencjał metaboliczny wykazywały szczepy oznaczone jako KC1.1 oraz KC1.13, które wykorzystywały większość cukrów, aminocukrów, aminokwasów, kwasów organicznych i ich pochodnych, alkoholi wielowodorotlenowych i kwasów uronowych. Pozostałe izolaty w tej grupie wykazywały zdolność do metabolizowania różnych substratów, jednak poziom ich wykorzystania był bardziej zróżnicowany i ograniczony.

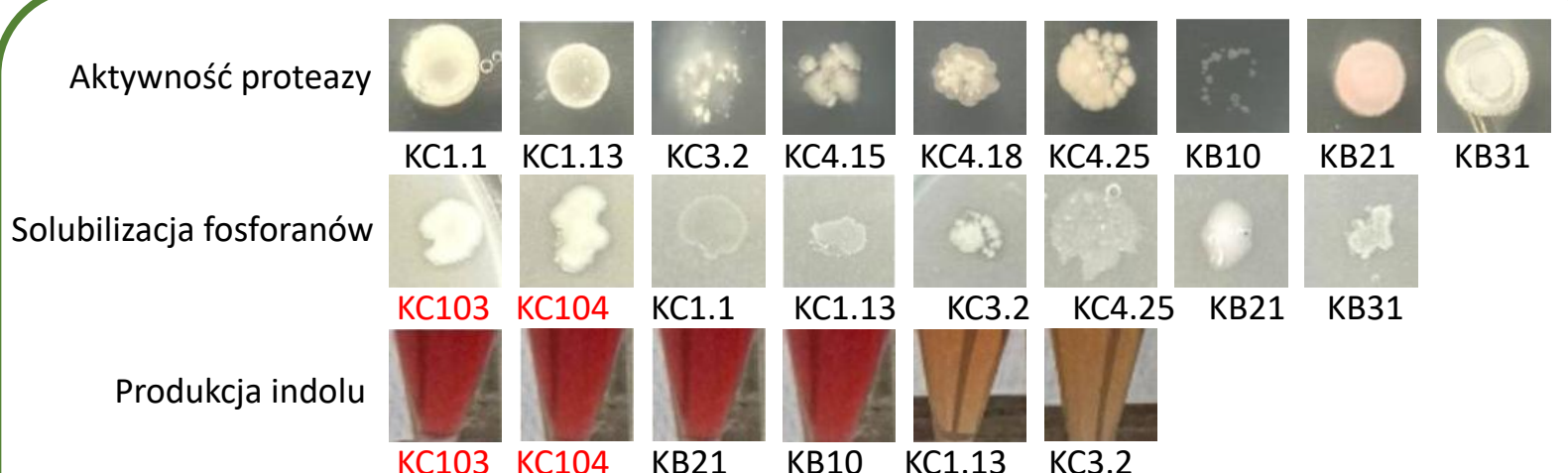


Fig. 3. Testy fenotypowe izolatów NRE: oznaczanie aktywności proteazy, solubilizacji fosforanów oraz zdolności do produkcji indolu. Szczepy KC103 i KC104 zostały wyizolowane z brodawek korzeniowych koniczyny łąkowej i stanowiły kontrolę, jako szczepy przynależące do rodzaju *Rhizobium*

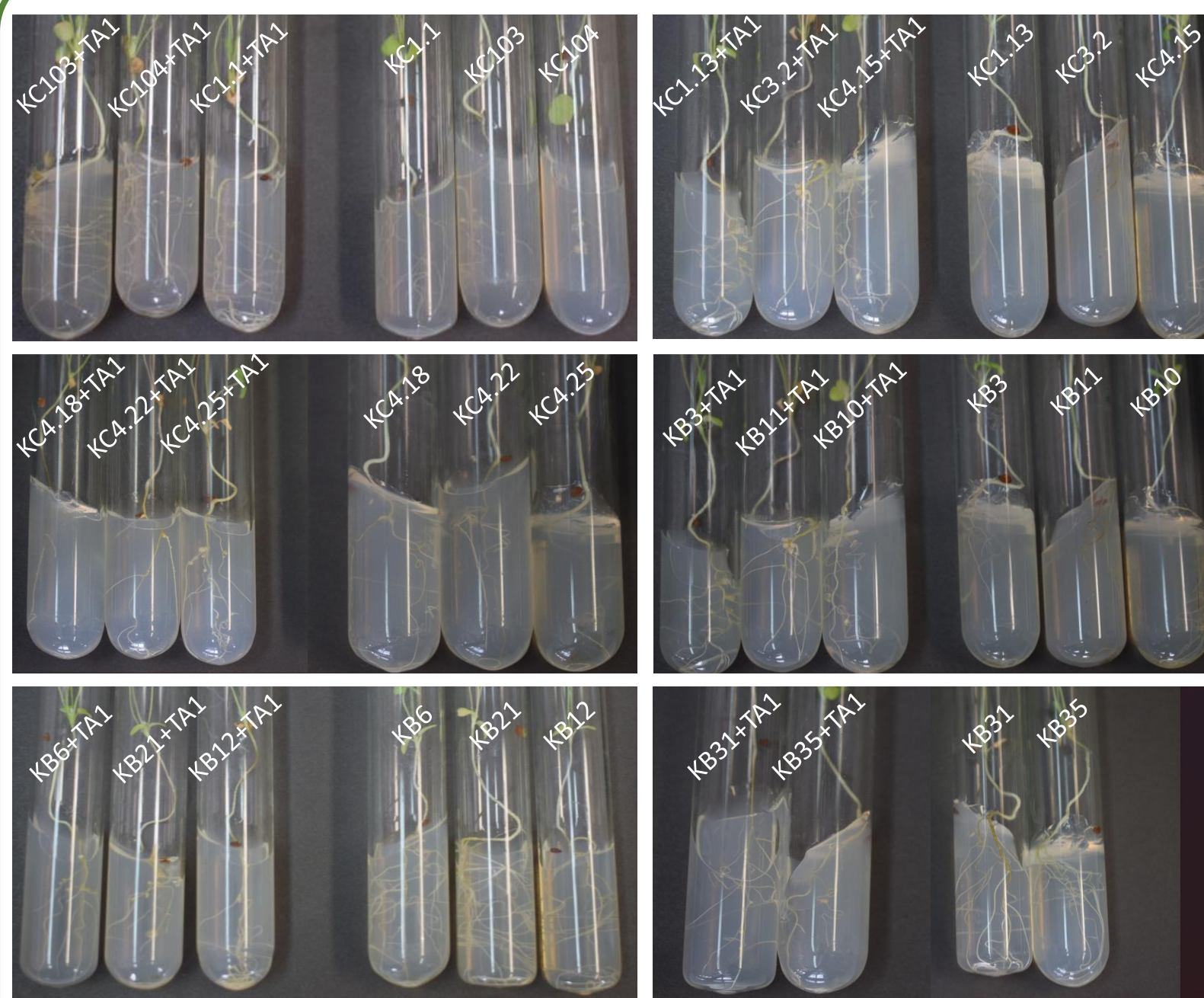


Fig. 4. Testy roślinne izolatów NRE obrazujące proces brodawkowania w inokulacji podwójnej (szczep NRE i referencyjny szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1) oraz w inokulacji pojedynczej szczepów NRE wyizolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej (KB3-KB35) i łąkowej KC1.1-104)