

Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate-*Rhizobium*

Marzena SUJKOWSKA

SUJKOWSKA M. 2009. **The infection process during legume-*Rhizobium* symbiosis.** *Wiadomości Botaniczne* 53(1/2): 35–53.

During the course of the development of nitrogen-fixing root nodules, tubules called infection threads (ITs) are cooperatively formed to deliver the bacterial symbiont from the root surface to the cells of the developing nodule. The ITs, a plant-derived tubular structure filled with dividing and growing bacteria, initiates from a kink curl of root hair cell and then traverses several underlying cortical cell layers to deliver bacteria to the nodule primordium. In legumes such as pea and soybean, the root hair IT is an intercellular space which represents an apoplastic (extracellular) tunnel into the root cells. Bacteria are released from the ITs through infection droplets, thereby entering the cytoplasm of the nodule cells, and differentiate into organelle-like symbiosomes. Subsequent division of the symbiosomes ultimately results in infected cells that become fully packed with N₂-fixing bacteroids. The IT growth and the mechanism by which the IT spreads from cell to cell through the developing nodule remains still open.

This review will present a part of the infection process, particularly in legumes that form indeterminate nodules. Indeterminate-type nodules present a unique opportunity to observe many developmental stages in a single nodule because their meristem continually generates new cells that undergo infection.

KEY WORDS: infection threads, root nodules, symbiosis

Marzena Sujkowska, Katedra Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: marzena_sujkowska@sggw.pl

WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* (określane jako ryzobia) oraz promieniowce z rodzaju *Frankia* indukują powstawanie brodawek na korzeniach roślin motylkowatych. Wszystkie z wymienionych bakterii należą do rodziny Rhizobiaceae. W brodawkach bakterie znajdują odpowiednie środowisko do redukcji azotu cząsteczkowego do amoniaku, który jest przyswajany przez roślinę (Hirsch 1992).

Nie wszystkie rośliny z rodziny Leguminosae (Fabaceae, Papilionaceae – motylkowate) brodawkują. Spośród trzech różnych podrodzin tej rodziny Caesalpinoideae (Brezylikowate), Mimosoideae (Mimozowate) i Papilionoideae (Motylkowate właściwe), w Caesalpinoideae liczba rodzajów zdolnych do symbiozy jest niewielka (Hirsch et al. 2001). Oprócz roślin motylkowatych, symbiotyczne wiązanie azotu występuje również u innych grup roślin w asocjacjach z *Frankia* (Hirsch 1992). Do roślin tych zwanych „actinorhizal plants” należą drzewa oraz

krzewy takie jak: *Casuarina* (rzewnia; Casuarinaceae Rzewniowate), *Alnus* (olsza; Betulaceae Brzozowate), *Myrica* (woskownica; Myricaceae Woskownicowate), *Elaeagnus* (oliwnik; Elaeagnaceae Rokitnikowate) i inne.

Brodawki indukowane przez ryzobia dzieli się zwykle na dwa typy, niezdeteminowane i zdeterminowane. W brodawkach niezdeteminowanych tkanka merystematyczna może funkcjonować przez cały okres wegetacyjny. Powstałe brodawki są cylindryczne, a w tkance bakteroidalnej można wyróżnić strefy od merystemu na szczycie brodawki do starzejącej się tkanki bakteroidalnej (Vasse et al. 1990). Brodawki typu zdeterminowanego są okrągłe, a ich merystem funkcjonuje krótko, w odpowiednim czasie ulega różnicowaniu w tkankę bakteroidalną, która nie wykazuje strefowości (Sprent, James 2007, Calvert et al. 1984). Typ niezdeteminowany występuje u lucerny, grochu, wyki, koniczyny (Newcomb et al. 1979). Brodawki typu zdeterminowanego powstają np. u soi, bobu, fasoli, komonicy (Hadri et al. 1998).

Brodawka korzeniowa jest organem o złożonej strukturze anatomicznej i cytologicznej, którego funkcją jest przyswajanie azotu cząsteczkowego. Wiążące azot brodawki stanowią doskonały model do badania procesów rozwojowych w roślinie (Patriarca et al. 2004). Za początek procesu infekcji przyjmuje się etap przyłączenia ryzobiów do wierzchołka włośnika korzeniowego rośliny. U większości roślin wytwarzających brodawki typu niezdeteminowanego, takich jak: groch, koniczyna i lucerna, ryzobia przedostają się do tkanek rośliny-gospodarza poprzez tubularne struktury określane jako nici infekcyjne. Powstają one w wyniku wrastania do wnętrza włośnika ściany komórkowej lub ściany komórek kory korzenia. Z nici ryzobia są uwalniane do cytoplazmy komórek gospodarza w procesie endocytozy, a następnie przekształcają się w wiążące azot cząsteczkowy bakteroidy. Wytworzenie nici infekcyjnych jest kluczowym etapem rozwoju brodawek korzeniowych. Pomimo znacznego postępu dokonanego w zakresie biologii molekularnej, genetyki i biochemii w odniesieniu do układu

symbiotycznego, mechanizm wzrostu, rozwoju i struktury nici infekcyjnych jest zagadnieniem najmniej poznanym.

PROCES PREINFEKcji

U większości roślin motylkowatych proces infekcji przez ryzobia rozpoczyna się w strefie włośnikowej korzenia rośliny-gospodarza (Newcomb, McIntyre 1981). Nawiązanie efektywnej symbiozy jest procesem wysoce specyficznym i wieloetapowym, jednakże stopień specyficzności nie jest jednakowy (Hadri et al. 1998) (Tab. 1). Rodzaj *Rhizobium* infekuje wiele roślin, podczas gdy inne szczepy ryzobiów wykazują zdolność do wchodzenia w efektywną symbiozę z ograniczoną liczbą gatunków roślin motylkowatych.

Inicjacja brodawki następuje wskutek wymiany cząsteczek sygnałowych pomiędzy rośliną i bakteriami symbiotycznymi (Mylona et al. 1995). Korzenie roślin motylkowatych wydzielają flawonoidy i betainy, które uaktywniają geny *NOD* ryzobiów. Geny te kodują 25 białek służących do bakteryjnej syntezy i eksportu czynnika Nod (Gage 2004). Czynniki Nod zbudowane są z łańcucha powtarzających się cząsteczek N-acetylglikozaminy, które „dekorowane” są różnymi grupami chemicznymi w zależności od rodzaju czynnika Nod. Związek ten jest lipooligosacharydem sygnałowym (Oldroyd, Downie 2004), który odgrywa kluczową rolę w początkowych oddziaływaniach ryzobiów z odpowiednią rośliną motylkową. Czynniki te inicjują wiele zmian rozwojowych w roślinie-gospodarzu we wczesnych etapach procesu nodulacji, m.in. skręcanie włośników korzeniowych, depolaryzację błon, oscylację poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia oraz inicjację podziałów komórkowych na terenie kory korzenia, które dadzą początek merystemowi brodawki (Gage 2004). Od lat 90-tych prowadzone są badania nad ustaleniem roślinnego receptora, który wiąże czynniki Nod. Wykazano, że receptor wiążący czynniki Nod występuje w błonie komórkowej włośnika (Hayashi et al. 2000). Nowsze badania opisują klasę receptorów kinazowych jako czynniki wiążących Nod (Geurts et al. 2003, Lipens et al. 2003,

Tabela 1. Specyficzność oddziaływań ryzobiowych (Hadri et al. 1998, zmienione).

Table 1. Rhizobial host specificity (Hadri et al. 1998, modified).

Rodzaj	Gatunek	Gospodarz roślinny
<i>Rhizobium</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>etli</i>	wyka, groch, soczewica, lędźwian fasola koniczyna fasola, wspania
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i>	soja, wspania
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. meliloti</i> <i>S. fredii</i>	nostrzyk, lucerna, kozieradka soja, wspania
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. loti</i> <i>M. huakuii</i>	komonica, łubin <i>Astragalus sinicus</i>

Parniske, Downie 2003). Kinazy są enzymami, które dołączają grupę fosforanową do innych białek regulując w ten sposób ich aktywność. Badania nad modelową rośliną motylkową *Lotus japonicus* wykazały, że receptorami są NFR1 i NFR5. Mutacje w obrębie tych genów powodowały u roślin brak reakcji na czynnik Nod i brak infekcji roślin przez ryzobia (Szczygłowski et al. 1998, Radutoiu et al. 2003, Parniske, Downie 2003). Radutoiu i współautorzy (2003) wykazali, że białka NFR1 i NFR5 zawierają dwa lub trzy zewnętrzne motywy LysM. Sekwencje te występują u wielu enzymów wiążących się z polimerami zawierającymi N-acetylglikozaaminę, w tym również z czynnikiem Nod. Białka NFR wiążą czynnik Nod poprzez ich zewnętrzne domeny LysM, a wiązanie to uruchamia kinazową kaskadę sygnałową. W kaskadzie tej uczestniczą białka DM11, DM12, NFP, NSP (Smith et al. 2007). Towarzyszy temu również wzrost stężenia $[Ca^{2+}]$ indukujący ekspresję genów wczesnej nodulacji (*ENOD11*, *ENOD12*) (Smith et al. 2007). Inne badania wykazały, że receptory LysM są zaangażowane również w późniejsze etapy procesu infekcji, gdyż ryzobia produkują czynnik Nod także w niciach infekcyjnych. U *Medicago truncatula* stwierdzono, że odpowiednik NFR1, LYK3 jest konieczny do późniejszego wzrostu nici infekcyjnych, podobnie jak u grochu odpowiednik NFR5, SYM10 (Madsen et al. 2003).

Po zasiedleniu ryzosfery ryzobia „przyczepiają się” do wierzchołków rozwijających się

włośników korzeniowych. Jest to proces dwu-etapowy (Van Spronsen et al. 1994). W pierwszym etapie ma miejsce adhezja odwracalna z udziałem bakteryjnego białka rikadhezyny wiążącego jony wapnia i zewnątrzkomórkowych polisacharydów na powierzchni włownika (Smith et al. 1989). Następnie bakterie wiążą się ściśle z powierzchnią włownika poprzez syntezę celulozowych fibryli, oplaszczających wierzchołek włownika korzeniowego (Smit et al. 1992). Czynnikiem przyspieszającym i wzmagającym proces adhezji bakterii do powierzchni korzeni roślin tworzących brodawki są lektyny gospodarza (Kijne et al. 1997). Lektyny są glikoproteinami wykazującymi zdolność do specyficznego rozpoznania i wiązania mono- i oligosacharydów oraz związków zawierających cukry. Lektyny nie wykazują specyficzności w stosunku do czynnika Nod, wiążą natomiast egzopolisacharydy na powierzchni ryzobiołów (Hayashi et al. 2000). Wiązanie się bakterii ze szczytem włownika wywołuje lokalny wzrost wydzielanego przez bakterie czynnika Nod niezbędnego dla zaginania wierzchołków włowników i rozwoju nici infekcyjnych (Van Brussel et al. 1992).

POWSTAWANIE NICI INFEKCYJNEJ WE WŁOŚNIKU

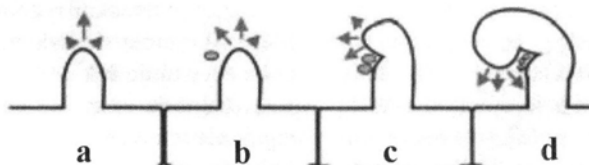
W odpowiedzi na obecność przyczepionych do włownika bakterii i wydzielanego przez nie czynnika Nod następuje skręcanie włowników

korzeniowych (w tzw. laski pasterskie), w których mogą się formować nici infekcyjne (Callaham, Torrey 1981). Najbardziej podatne na infekcje są włośniki, które prawie zakończyły wzrost (Gage 2004). Skręcenie włośnika jest wywołane wzrostem ekspansji ściany po przeciwległej stronie do tworzącej się wokół bakterii niszy (Brewin 2004) lub zahamowaniu wzrostu ściany w miejscu adhezji bakterii (Ryc. 1). Wykazano, że bakteryjny czynnik Nod może hamować biosyntezę ściany komórkowej włośnika (Doblin et al. 2002). Podobne skręcanie włośników obserwowano po zastosowaniu inhibitorów syntezy celulozy i innych czynników stresujących (Esseling et al. 2004).

Depolaryzacja aktyny we włośnikach korzeniowych jest jednym z najwcześniejszych objawów wywołanych przez bakteryjny czynnik Nod (Cárdenas et al. 1998, Miller et al. 1999). We włośnikach korzeniowych fasoli obserwowano dynamiczne zmiany w układzie mikrofilamentów aktyny pod wpływem wydzielanego przez *Rhizobium etli* czynnika Nod (Cárdenas et al. 1998). Obserwowano zmianę układu mikrofilamentów z podłużnego w stosunku do osi długiej włośnika na rozproszony, skoncentrowany w jego części szczytowej. Deformacje włośników są regulowane przez roślinne hormony takie jak etylen, który hamuje przekazywanie czynnika Nod i wpływa na stopień deformacji i częstotliwość infekcji (Oldroyd et al. 2001). W ukierunkowanym wzroście nici uczestniczą również mikrotubule cytoskieletu (Bakhuizen

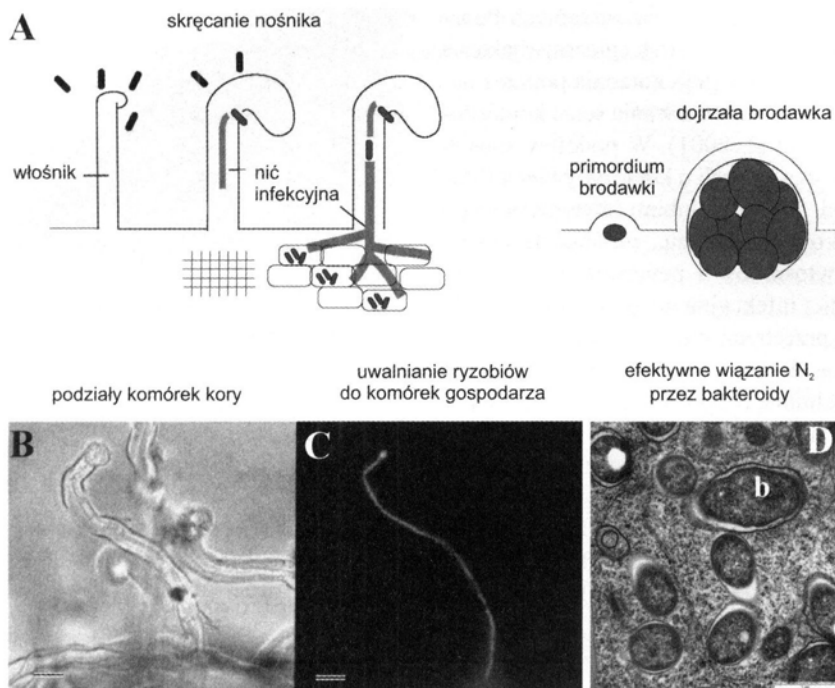
et al. 1988, Timmers et al. 1999). Ponadto, pod wpływem czynnika Nod, następuje w ciągu kilku sekund depolaryzacja błon i oscylacja wewnątrzkomórkowego $[Ca^{2+}]$ w części szczytowej włośnika (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1998).

Infekcja komórek gospodarza rozpoczyna się po unieruchomieniu bakterii pomiędzy ścianami skręconego włośnika. Zwykle ma to miejsce na szczycie włośnika, ze względu na cieńszą w tym miejscu ścianę komórkową (Hirsch 1992). Mechanizm wnikania bakterii nie jest rozstrzygnięty – może to następować wskutek lokalnej degradacji ściany i wzrostu ściany włośnika do wnętrza komórki w miejscu skręcenia lub wskutek tworzenia nowego pokładu ściany na wewnętrznej ścianie włośnika po wcześniejszej jej lokalnej degradacji. Pozostaje otwartym pytanie, roślina czy bakteria jest odpowiedzialna za degradację ściany? Ryzobia posiadają enzymy degradujące zarówno celulozę jak i inne roślinne polisacharydy (Morales et al. 1984, Zorreguieta et al. 2000). Rośliny również mają zdolność degradacji własnych ścian komórkowych. Ściany komórkowe podlegają rozluźnieniu podczas powstawania włośników korzeniowych, dojrzewania owoców, kiełkowania łagiewek pyłkowych i odcinania liści (Cosgrove et al. 2002). U lucerny siewnej wykazano indukcję genu *MsPG3* kodującego poligalakturonazę, której synteza następuje specyficznie we włośnikach korzeniowych w wyniku infekcji *Sinorhizobium meliloti* (Munoz et al. 1998). Poligalakturonaza



Ryc. 1. Skręcenie włośnika korzeniowego. (a) Szczytowy wzrost włośnika korzeniowego przedstawia wzrost ściany komórkowej włośnika wokół jego części apikalnej (strzałki). (b) Pod wpływem czynnika Nod wydzielanego przez przyczepione do włośnika ryzobia następuje nierówny wzrost ściany komórkowej włośnika. (c) Intensywny wzrost ściany komórkowej i namnażanie bakterii produkujących czynnik Nod prowadzi do skręcenia włośnika (d) (Brewin 2004, zmienione).

Fig. 1. The root hair curling. (a) Apical growth of root hair cell, showing cell wall growth around the apical part (arrows). (b) Nod-factor application from an attached bacteria to root hair results in a disproportionate rate of cell wall growth. (c) Intensive cell wall growth and bacterial propagation producing Nod-factor leads to root hair curling (d) (Brewin 2004, modified).



Ryc. 2. Proces infekcji przez *Rhizobium* (Okazaki et al. 2004, zmienione). A – schemat procesu infekcji przez *Rhizobium*. B – skręcony włosek u *Lotus japonicus*. C – komórki *Mesorhizobium loti* znakowane *gfp* w nici infekcyjnej we włosniku. D – bakteroidy (b) *Rhizobium leguminosarum* w komórkach zainfekowanych brodawki grochu zwyczajnego *Pisum sativum* (Sujkowska npubl.).

Fig. 2. The *Rhizobium* infection process (Okazaki et al. 2004, modified). A – scheme of infection process by *Rhizobium*. B – root-hair curling in *Lotus japonicus*. C – *Mesorhizobium loti* cells tagged with constitutive *gfp* gene in an infection thread in the root hair. D – *Rhizobium leguminosarum* bacteroids (b) in infected cells of mature *Pisum sativum* nodule (Sujkowska unpubl.).

jest enzymem ściany biorącym udział w degradacji pektyn (Ljunggren, Fahraeus 1961).

W skręconym włosniku bakterie rosną i dzielą się w swoistych „tunelach” jakimi są nici infekcyjne (Hirsch et al. 2001). Nici infekcyjne rosną szczytowo wewnątrz włosnika, kierując się ku jego podstawie (Ryc. 2). Po dotarciu nici infekcyjnej do podstawy włosnika ściana nici łączy się ze ścianą komórkową, uwalniając bakterie pomiędzy ścianą epiblemy, a ścianą komórkową infekowanej komórki kory znajdującej się poniżej. W kolejnych warstwach komórek kory ma miejsce szczytowy wzrost nici infekcyjnej. Do zakończenia rosnącej szczytowo nici dołączane są pęcherzyki z aparatów Golgiego zawierające zarówno prekursorzy ściany nici jak i błony otaczającej jej wierzchołek. W ukierunkowanym

wzroście nici infekcyjnych bierze udział jądro komórkowe połączone ze szczytem nici poprzez grube pasmo cytoplazmy (nici preinfekcyjne) i mikrotubule cytoszkieletu (Bakhuizen et al. 1988, Gage 2004).

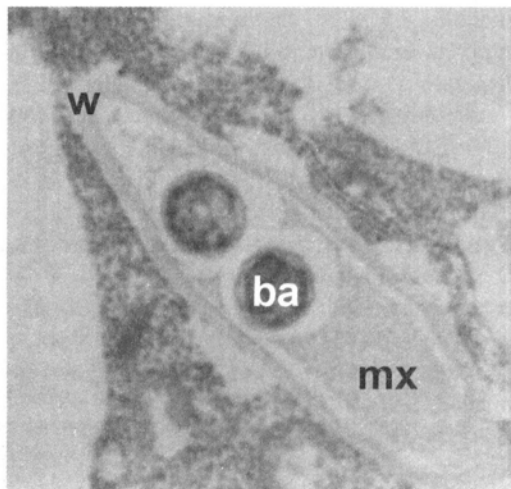
Tworzenie nici infekcyjnych we włosnikach korzeniowych jest charakterystyczne dla większości roślin motylkowatych takich jak groch, fasola, soja i lucerna. Istnieją również alternatywne modele infekcji, w trakcie których nie powstają nici infekcyjne. Infekcja poprzez tzw. *crack entry* następuje pomiędzy komórką epiblemy i/lub korą korzenia poprzez przestwory międzykomórkowe lub blaszkę środkową, jak ma to miejsce na przykład u orzecha ziemnego (*Arachis*). Nie powstają tu nici infekcyjne zarówno we włosnikach jak i brodawkach

tworzących się wyłącznie na korzeniach bocznych. Po zasiedleniu komórek epidermy bakterie przemieszczają się w głąb korzenia poprzez naturalnie tworzące się rozzerwania ścian komórkowych (Uheda et al. 2001). W podobny sposób zachodzi proces infekcji u koniczyny białej (Mathesius et al. 2000). U łubinu, wytwarzającego brodawki kołnierzykowate, ryzobia wywołują skręcanie włóśników i penetrują ścianę włóśnika, ale nici infekcyjne nie powstają. Bakterie kolonizują przestrzeń pomiędzy błoną a ścianą komórkową. Bakterie następnie są otaczane błoną i uwalniane bezpośrednio do cytoplazmy merystematycznych komórek kory korzenia (Łotocka et al. 2000). Podobny typ infekcji poprzez nieuszkodzoną epidermę opisano u drzewiastej motylkowatej *Mimosa scabrella* (Faria de et al. 1986). Penetracja epidermy korzenia następuje przez rozpuszczenie blaszki środkowej radialnych ścian komórkowych.

KOMPOZYCJA NICI INFEKCYJNYCH

Nić infekcyjną jest tworem apoplastowym, którego synteza i budowa jest podobna do ściany komórkowej rośliny. Nici infekcyjne otoczone są błoną komórkową gospodarza i ścianą (z wyjątkiem ich zakończeń), a wewnątrz nici wypełnia matriks (Ryc. 3) (Callaham, Torrey 1981). Badania na brodawkach grochu z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał wykazały, zarówno w ścianie komórkowej jak i w ścianie nici infekcyjnych, obecność celulozy, ksyloglukanu i pektyn (Rae et al. 1992, Pawloski, Bisseling 1996). Wykazano jednak, że ściana nici jest bardziej odporna na traktowanie enzymami degradującymi ścianę komórkową (Higashi et al. 1987), co może sugerować o jej modyfikacji (np. o wysokim stopniu usztywnienia). Niektóre ze składników nici infekcyjnych przedstawiono w Tabeli 2.

Wewnątrz nici wypełnia matriks zawierająca bakteryjne polisacharydy (Niehaus et al. 1993) i glikoproteiny roślinne (Vandenbosch et al. 1989, Rae et al. 1992, Pawloski, Bisseling 1996), które są antygenowo podobne do białek zlokalizowanych w przestworach międzykomórkowych



Ryc. 3. Mikrografia elektronowa nici infekcyjnej z brodawki korzeniowej grochu (Sujkowska npbl). Nić infekcyjna jest tubularną strukturą otoczoną ścianą (w), a wewnątrz jej wypełnia matriks (mx) z bakteriami (ba).

Fig. 3. The electron micrograph image of infection thread from pea root nodule (Sujkowska unpubl.). Infection thread is tubular structure surrounded by the wall (w) and the lumen contains matrix (mx) with bacteria (ba).

korzenia (Vandenbosch et al. 1989, Rae et al. 1992). Pod wpływem ryzobiów roślina syntetyzuje nowe komponenty (wczesne noduliny), które modyfikują właściwości ściany komórkowej i jej matriks (Cassab 1998). Wiele z tych wczesnych nodulin są to glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę. W ścianie i matriks nici infekcyjnych stwierdzono obecność specyficznej grupy brodawkowych ekstensyn (Vandenbosch et al. 1989, Rathbun et al. 2002). Ekstensyny tworzą w ścianach sieci białkowe wzmacniające i stabilizujące ściany, a więc przeciwdziałające ich rozciąganiu (Cassab 1998). Brodawkowe ekstensyny są to białka bogate w hydroksyprolinę, występujące w dużych ilościach w matriks nici infekcyjnych (Vandenbosch et al. 1989, Rathbun et al. 2002). Zawierają one sekwencje aminokwasowe charakterystyczne zarówno dla ekstensyn jak i białek arabinogalaktanowych (Gamas et al. 1996). Ze względu na dużą zawartość węglowodanów są one bardziej rozpuszczalne od typowych ekstensyn (Brewin 2004). Białka te biorą udział w przebudowie ścian

Tabela 2. Komponenty nici infekcyjnych (Brewin 1998, Broughton et al. 2000, zmienione).

Table 2. Components of infection threads (Brewin 1998, Broughton et al. 2000, modified).

Komponenty	Lokalizacja	Źródło literaturowe
Rośliny motylkowate		
ATPaza	MP*	Federova et al. 1999
Celuloza	ściana	Rae et al. 1992
Ksyloglukan	ściana	Rae et al. 1992
Pektyny		
Estryfikowane	ściana	Rae et al. 1992
Deestryfikowane	ściana	Rae et al. 1992
Ekstensyny (<i>MtN12</i> , <i>VfNDS-E</i>)	matriks	Brewin et al. 1994
Białka bogate w prolinę (<i>ENOD12</i>)	matriks	Wilson et al. 1994, Sherrier, Vandenbosch 1994
Białka <i>ENOD5</i>	ściana	Fruhling et al. 2000
Białka arabinogalaktanowe	matriks	Scheres et al. 1990
Lipoksygenaza	matriks	Gardner et al. 1996
<i>Rhizobium</i>		
Cykliczne β -(1,6) β -(1,3)-glukany	?	Dunlap et al. 1996
Egzopolisacharydy	?	Niehaus et al. 1993, Skorupska et al. 1995
Bursztynoglukan	?	Cheng, Walker 1998
Lipopolisacharydy	matriks	Dazzo et al. 1991
Wydzielane białka (NolJ, NolX, y4xLi inne)**	?	Viprey et al. 1998
NOD0	?	Downie 1998, Walker, Downie 2000

* – membrana peribakteroidalna; ** – wydzielane przez *Rhizobium*, ale ich obecność w niciach infekcyjnych nie została jeszcze potwierdzona.

* – peribacteroid membrane; ** – secreted from *Rhizobium* but their presence in infection threads has not yet been confirmed.

komórkowych w trakcie powstawania brodawek i regulacji przebiegu infekcji (Brewin 2004).

U grochu w matriks nici występują białka bogate w prolinę (kodowane przez *ENOD11*) związane ze ścianą komórkową i z rozwojem nici infekcyjnych oraz *ENOD12*, którego ekspresja zachodzi w komórkach z niemi infekcyjnymi i w komórkach merystematycznych (Wilson et al. 1994, Journet et al. 2001); białka bogate w prolinę (Sherrier, Vandenbosch 1994) zidentyfikowane jako wczesne noduliny (*ENOD12*, *ENOD10*, *ENOD11*); glikoproteiny, które oprócz proliny zawierają również stosunkowo dużo alaniny, glicyny i seryny, podobnie jak glikoproteiny arabinogalaktanowe będące składnikami ścian komórkowych (*ENOD5* – białko kodowane przez ten gen jest składnikiem ściany nici infekcyjnej) (Fruhling et al. 2000) i białka arabinogalaktanowe *ENOD16* i *ENOD20*

(Scheres et al. 1990, Vernoud et al. 1999) oraz nadtlenuk wodoru (Santos et al. 2001, Herouart et al. 2002). Nadtlenuk wodoru, może wiązać krzyżowo specyficzne ekstensyny i modulować właściwości matriks nici infekcyjnych (Santos et al. 2001, Rathbun et al. 2002). Tłumaczyłoby to mocne usztywnienie nici infekcyjnych i ich odporność na rozkład pod wpływem enzymów degradujących ścianę komórkową (Higashi et al. 1987). Inny dowód na udział reaktywnych form tlenu w regulacji wzrostu nici infekcyjnych dostarczają badania dotyczące ekspresji genów peroksydaz (Cook et al. 1995) i obecność antygeny lipoksygenazy w matriks nici infekcyjnych (Gardner et al. 1996). U grochu wykazano również aktywność oksydazy dwuaminy w matriks ściany komórkowej (Laurenzi et al. 2001) oraz w matriks nici infekcyjnej (Wisniewski et al. 2000).

CZYNNIKI BAKTERYJNE ZAANGAŻOWANE WE WZROST NICI INFEKCYJNYCH

Walker i Downie (2000) wykazali, że koniec nieredukujący czynnika Nod jest niezbędny do tworzenia funkcjonalnych nici infekcyjnych. Ekspresja genu *NOD0* (białko bakteryjne odpowiedzialne za tworzenie porów w błonach) może niwelować defekt nici infekcyjnych spowodowany przez mutację *NOD*, której wynikiem jest synteza czynnika Nod pozbawionego podstawnika specyficznego dla rośliny-gospodarza.

Do wzrostu nici infekcyjnych i rozwoju wiążących azot brodawek wymagana jest obecność bakteryjnych powierzchniowych egzo- (EPS) i lipopolisacharydów (LPS) (Cheng, Walker 1998, Janczarek et al. 2001). U ryzobiów występuje przynajmniej pięć ważnych polisacharydów: EPS I, EPS II, antygeny K, LPS oraz cykliczne β -glukany. Trzy z nich wymienione jako pierwsze biorą udział w rozciąganiu nici infekcyjnych (Frayse et al. 2003). Antygeny K (zwane kapsularnymi polisacharydami) pomagają w wytwarzaniu nici infekcyjnych, ich rozciąganiu oraz w rozwoju brodawek (Pellock et al. 2000). EPS ryzobiowe odgrywają ważną rolę we wzroście nici infekcyjnych (Janczarek et al. 2001). EPS są niezbędne u roślin wytwarzających brodawki niezdeteminowane (Becker, Pühler 1998; Skorupska et al. 2006), jednakże u roślin, na których formowane są brodawki zdeterminowane te związki nie są konieczne (Gray, Rolfe 1990; Cheng, Walker 1998). EPS biorą udział w infekcji i rozwoju brodawek, uwalnianiu bakterii z nici infekcyjnych oraz w rozwoju bakteroidów (Niehaus et al. 1993; Skorupska et al. 2006). Najdokładniej poznanym EPS'em u ryzobiów jest bursztynoglukana, nazywany także EPS I, wytwarzany przez *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium* i *Alcaligenes* (Gonzales et al. 1996). EPS wytwarzany przez *Rhizobium* sp. NGR234 jest strukturalnie podobny do bursztynoglukana. Poza syntezą bursztynoglukana *S. meliloti* jest zdolny do wytwarzania drugiego typu

egzopolisacharydu – galaktoglukana (EPS II). Wykazano, że brak EPS I i EPS II prowadzi do wytwarzania brodawek zdeformowanych (Skorupska et al. 1995, Becker, Pühler 1998), które nie są infekowane przez bakterie, jak ma to miejsce na przykład w brodawkach indukowanych przez mutanty *Sinorhizobium meliloti* na korzeniach lucerny (Becker, Pühler 1998) lub mogą być infekowane jedynie częściowo, jak w przypadku brodawek powstałych na konicznie indukowanych mutantem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Skorupska et al. 1995). Mutanty *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* z defektem EPS podobnie jak *S. meliloti* nie tworzyły efektywnych asocjacji z ich roślinnymi gospodarzami (Borthakur et al. 1986) lub powodowały powstawanie małych, nieefektywnych brodawek na wyce (Van Workum et al. 1995). Ponadto EPS I bierze udział w organizacji cytoszkieletu we włóśnikach korzeniowych w taki sposób, aby zakończenia nici infekcyjnej szybko rosły i były silnie spolaryzowane (Pellock et al. 2000). Defekt w syntezie LPS u *Rhizobium* również hamował rozwój brodawek, a bakterie nie były uwalniane z nici infekcyjnych (Priefer 1989). W przeciwieństwie do EPS defekt w syntezie LPS ma duże znaczenie dla roślin wytwarzających brodawki zdeterminowane. Na przykład *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z defektem syntezy LPS powodował hamowanie wzrostu nici we włóśnikach i powstawanie na fasoli małych, podobnych do brodawek guzów pozbawionych bakterii (Noel et al. 1986). Wykazano również, że EPS, LPS, kapsularne polisacharydy i glukany tłumią reakcje obronne rośliny (D'Haeze, Holsters 2004).

AKTYWACJA KOMÓREK KORY I ROZRZASTANIE NICI INFEKCYJNYCH

Równocześnie z procesem infekowania włóśników mają miejsce podziały odległych od nici infekcyjnych komórek kory i powstawanie primordiów (związków) brodawki. Primordia mogą tworzyć się zarówno na terenie kory wewnętrznej korzenia (typ brodawki

niezdeteminowany) jak i w korze zewnętrznej korzenia (typ zdeterminowany) w zależności od rośliny-gospodarza (Brewin 1991, Hirsch 1992). Miejsca, w których powstaną brodawki są ściśle określone. Zwykle tworzone są naprzeciw wiązek protoksylemu (Mylona et al. 1995). Lokalizacja primordiów zależy od różnych cząsteczek sygnałnych, wśród których urydyna (tzw. *stele factor*) działa lokalnie jako aktywator podziałów komórkowych (Hadri, Bisseling 1998). Związkiem hamującym podziały jest etylen syntetyzowany w perycyklu, który dyfundując do komórek kory blokuje podziały komórkowe naprzeciw wiązek floemu (Hadri, Bisseling 1998).

U roślin motylkowatych takich jak groch i lucerna, na korzeniach których powstają brodawki typu niezdeteminowanego, primordia powstają na terenie kory wewnętrznej korzenia, a zatem nici infekcyjne w tym typie brodawek muszą przemieścić się przez komórki kory zewnętrznej zanim dotrą do zawiązka brodawki. Nawet przed opuszczeniem przez nici epiblemy korzenia, w komórkach kory i perycyklu następują lokalne zmiany jako reakcja na obecność ryzobiów. W komórkach perycyklu ma miejsce gwałtowna indukcja *ENOD40* w obszarach naprzeciw wiązek protoksylemu oraz przebudowa mikrotubuli (Timmers et al. 1999, Compaan et al. 2001). Przemieszczanie nici infekcyjnych poprzedzają również zmiany morfologiczne komórek kory. Wytworzenie primordium brodawki poprzedza zmiana układu mikrotubuli w komórkach kory korzenia (Timmers et al. 1998). W korze zewnętrznej korzenia powyżej rozwijającego się primordium brodawki, cytoplazma kolumny komórek kory zmienia położenie z części peryferycznych ku środkowi, jak ma to miejsce w trakcie podziału komórki, jednakże ich podział zostaje zatrzymany w fazie G2 (Geurts, Bisseling 2002). Tworzą one pasma cytoplazmy tzw. nici preinfekcyjne, przez które będą się przemieszczać nici infekcyjne w kierunku primordium brodawki (Van Brussel et al. 1992). Nici preinfekcyjne wyznaczają ścieżkę niciom infekcyjnym poprzez komórki kory korzenia.

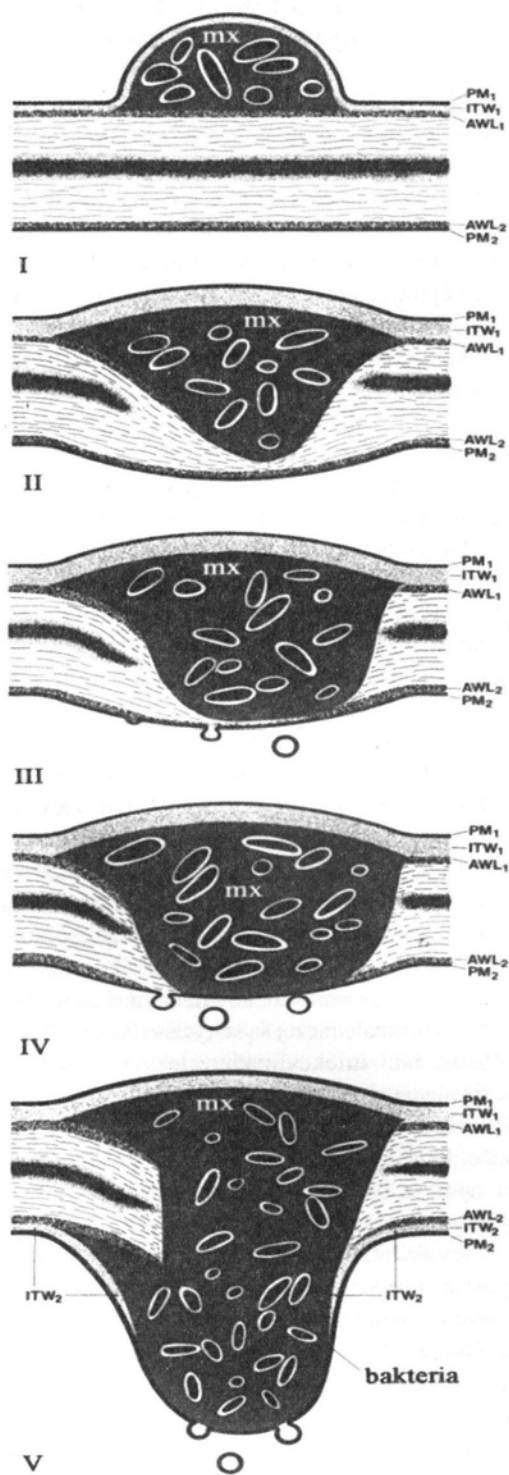
WZROST NICI INFEKCYJNYCH W ROSNĄCEJ BRODAWCE

Nici infekcyjne mają za zadanie „przenieść” bakterie z włośników poprzez komórki kory do primordium brodawki, a następnie uwolnić je do cytoplazmy komórki gospodarza. Nici infekcyjne rozwijające się z włośników korzeniowych rosną szczytowo i muszą wzrastać i rozciągać się, używając tych samych mechanizmów, które umożliwiały wzrost włośników zanim nastąpiła infekcja (Gage 2004). Komórki środkowe primordium, przez które nie przeszły nici infekcyjne, odróżnicowują się i tworzą merystem brodawki, który następnie rozwija się dystalnie do rosnącej sieci nici infekcyjnych (Geurts, Bisseling 2002).

Proces przemieszczania się nici infekcyjnych z komórki do komórki nie jest jeszcze w pełni poznany. Uważa się, że następuje to wskutek częściowej degradacji ścian komórek gospodarza (Bakhuizen et al. 1988, Van Spronsen et al. 1994) (Ryc. 4).

Cytoskielet rośliny kontroluje orientację wzrostu nici poprzez kierowanie pęcherzyków zawierających pektyny do jej szczytu (Rae et al. 1992). Uważa się, że wzrost nici infekcyjnych polega na wydzielaniu glikoprotein matriks ściany do wnętrza nici (Rathbun et al. 2002) oraz na intensywnym namnażaniu się ryzobiów w pobliżu końca nici infekcyjnych (Gage 2002). Bakterie bliżej szczytu nici infekcyjnej aktywnie rosną, pozostałe raczej są statyczne (Gage 2002). Wzrost nici infekcyjnych zależy również od utrzymania w odpowiednim stanie matriks nici. Brewin (2004) zaproponował przedstawiony poniżej (Ryc. 5) model wzrostu nici infekcyjnych w oparciu o stopień kondensacji matriks nici i właściwości ekstensyn.

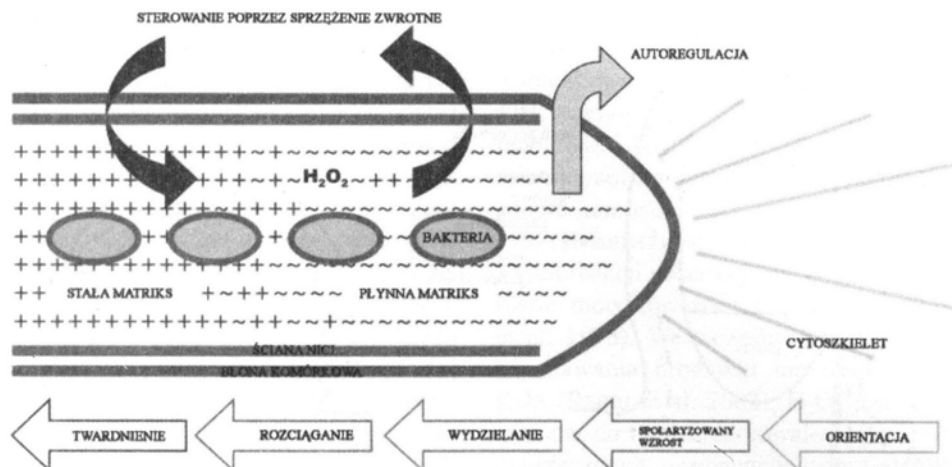
Wydłużanie nici infekcyjnych wykazuje pewne wspólne cechy ze wzrostem łagiewki pyłkowej (Gualteri, Bisseling 2000). Potwierdza to fakt, że wczesne noduliny *ENOD8* wykazują duże podobieństwo do genu *PO22*, którego ekspresja zachodzi w ziarnach pyłku przed kiełkowaniem (Wu et al. 1996). Proces wzrostu i wydłużania nici infekcyjnych związany jest



również z aktywnością ekspansyn (Sujkowska et al. 2007), białek ściany komórek roślinnych. Ekspansyny odgrywają ważną rolę we wzroście i różnicowaniu tkanek oraz organów roślinnych (Chao, Kende 1998). Uważa się, że biorą one udział we wszystkich tych procesach, które wymagają rozluźnienia i modyfikacji struktury ściany komórkowej. Ekspansyny posiadają niezwykłą zdolność rozluźniania struktury ściany komórkowej w warunkach *in vitro* i *in vivo* (Cosgrove 1989, Mc Queen-Mason et al. 1992, Cosgrove 1999, Li et al. 2002, Yennawar et al.

Ryc. 4. Przerastanie nici infekcyjnej przez ścianę komórkową (wg Bakhuizen et al. 1988, zmienione). I – proces rozpoczyna się po fuzji błony otaczającej szczyt nici z błoną komórkową. Dodatkowy pokład ściany pojawia się zarówno po stronie przerastania nici przez ścianę komórkową gospodarza niż traci swoją tubularną strukturę. Komórki ryzobiów otacza matriks nici i stopniowo przemieszczają się przez ścianę komórkową gospodarza do infekowanej komórki; III – migracja ryzobiów ustaje w momencie osiągnięcia przez szczyt nici ściany komórkowej infekowanej komórki; IV – obydwie ściany komórkowe gospodarza ulegają degradacji w rejonie przemieszczania nici infekcyjnej. Błona otaczająca szczyt nici infekcyjnej ulega pofałdowaniu w następstwie przyłączania licznych pęcherzyków z aparatów Golgiego; V – wzrost nici infekcyjnej po stronie infekowanej komórki rozpoczyna uwypuklenie błony komórkowej gospodarza. Pęcherzyki z aparatów Golgiego dostarczają materiał zarówno do syntezy ściany nici jak i błony otaczającej jej wierzchołek. AWL₁, AWL₂ – dodatkowy pokład ściany komórkowej; ITW₁, ITW₂ – ściana nici infekcyjnej; mx – matriks nici infekcyjnej; PM₁, PM₂ – błona komórkowa.

Fig. 4. Wall crossing by an infection thread (Bakhuizen et al. 1988, modified). I – the process started with a fusion of the thread membrane at the thread apex with the host cell plasma membrane. Deposition of additional wall layer occurred both at the flattened infection thread wall and at the infected cell; II – During its growth along the host wall the infection thread lost its tubular structure. The rhizobial cells are surrounded by thread matrix and gradually migrate through the cell wall into the infected cell; III – the migration of the rhizobium ceases as soon as the infection thread tip reaches the cell wall of infected cell; IV – both host cell walls undergo degradation in the region of infection thread penetration. The thread tip membrane invaginates due to fusion of many vesicles derived from Golgi; V – infection thread growth from a penetration site started with an invagination of host plasma membrane. The Golgi-derived vesicles supply material for infection thread wall synthesis and/or membrane of thread tip. AWL₁, AWL₂ – additional cell wall layers; ITW₁, ITW₂ – infection threads wall; mx – infection threads matrix, PM₁, PM₂ – plasma membrane.



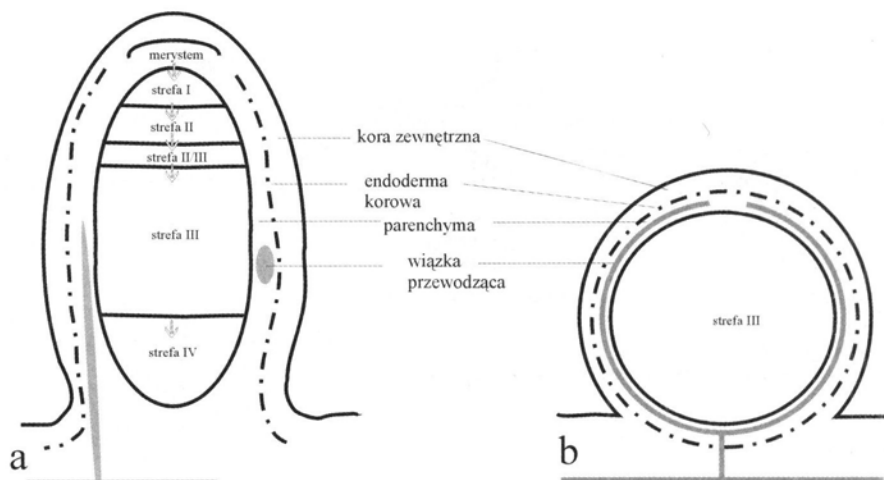
Ryc. 5. Model wzrostu nici infekcyjnej (IT) (Brewin 2004, zmienione). Wzrost IT ma miejsce na jej szczycie. Początkowo matriks nici jest w postaci płynnej i bakterie mogą w niej rosnąć i namnażać się (Gage 2002). W przybliżeniu 60 μm za punktem wzrostu na szczycie nici bakterie przestają się dzielić i matriks nici ulega „usieciowieniu” wskutek działalności m.in. ekstensyn. Rozgałęzione łańcuchy arabinogalaktanu umożliwiają przekształcenie ekstensyn z formy białek rozpuszczalnych, w bardziej typową formę ekstensyn przy udziale nadtlenu wodoru i przekształceniu płynnej matriks w stałą (Herouart et al. 2002). Sterowanie poprzez sprzężenie zwrotne, kontrolujące ilość związanych białek przez nadtlenek wodoru, wpływa na wzrost nici infekcyjnej (Shaw, Long 2003). Bakteryjne zewnątrzkomórkowe polisacharydy pomagają w utrzymaniu matriks nici w stanie płynnym. Dysmutaza ponadtlenkowa i inne enzymy bakteryjne mogą ułatwiać przetrwanie bakteriom w obecności nadtlenu (Santos et al. 2001). Bakterie w nici kontynuują wydzielanie czynnika Nod lub mogą istnieć jeszcze inne czynniki regulujące wzrost nici.

Fig. 5. Model of the growth of an infection thread (IT) (Brewin 2004, modified). IT growth is located at its apex. Initially, the matrix is a fluid phase and the bacteria are able to divide (Gage 2002). Approximately 60 μm behind the growing point on thread apex rhizobial cells cease to divide, and thread matrix becomes solidified as a result of protein cross-linking (extensin). Cleavage of the arabinogalactan side chains would convert extensin from a soluble glycoprotein into a more conventional extensin by peroxide, thus promoting the fluid-to-solid transition (Herouart et al. 2002). Feedback control systems, that regulate the rate of protein cross-linking by peroxide, could modulate infection threads growth (Shaw, Long 2003). Bacterial extracellular polysaccharides keep the matrix fluid. Superoxide dismutase and other bacterial enzyme systems may help rhizobia to survive in the presence of peroxide (Santos et al. 2001). Bacteria within the thread continue to secrete Nod-factor, or alternatively there may be another signal required for regulation of thread growth.

2006), nie wykazują przy tym żadnej znanej enzymatycznej aktywności (McQueen-Mason, Cosgrove 1995). Mechanizm ich działania pozostaje nadal zagadkowy. Uważa się, że białka te rozrywają wiązania wodorowe pomiędzy polisacharydami ściany komórkowej, umożliwiając „ślizganie się” sąsiadujących polimerów względem siebie. Immunolokalizacja ekspansyny wykazała jej obecność w ścianie nici infekcyjnych w trakcie rozwoju brodawek korzeniowych grochu (Sujkowska et al. 2006). U konicyzny stwierdzono wzrost ekspresji genu ekspansyny *MaEXPI* zarówno w korzeniach jak i w rosnących brodawkach (Giordano, Hirsch 2004). Podobnie, u *Lotus japonicus* stwierdzono

ekspresję genu ekspansyny *LjEXP* w zainfekowanych korzeniach i w początkowych etapach rozwoju brodawek (Flemetakis et al. 2004).

W brodawkach typu niezdecydowanego merystem brodawki nie podlega infekcji. Nieprzerwanie różnicuje nowe komórki i stopniowo oddala się od korzenia. Za oddalającym się merystem podążają nici infekcyjne, infekując nowo podzielone komórki (Gage 2004). Rozrośnięta sieć nici infekcyjnych tuż pod merystem tworzy tzw. strefę penetracji nici infekcyjnych lub strefę I (Vasse et al. 1990, Gage 2004) (Ryc. 6). W strefie tej bakterie sporadycznie uwalniają się z nici infekcyjnych do cytoplazmy komórek brodawki, a następnie



Ryc. 6. Schemat przedstawiający brodawki typu niezdeteminowanego i zdeterminowanego. a – brodawka niezdeteminowana. Centralną tkankę można podzielić na pięć stref (Vasse et al. 1990). Za apikalnie umieszczonym merystemem występuje strefa I (strefa nici infekcyjnych). W strefie II (strefa młodej symbiozy) następuje uwalnianie bakterii z nici i infekcja komórek. Strefę przejściową II/III charakteryzuje obecność dużych amyloplastów. Intensywny proces wiązania N_2 ma miejsce w strefie III (wiązania azotu). Strefa IV (strefa starzenia) reprezentuje obszar, w którym ma miejsce degradacja bakteroidów. Brodawkę otaczają tkanki peryferyczne: kora, endoderma i parenchyma. Ta ostatnia stanowi barierę dyfuzyjną, która reguluje ilość tlenu dostarczaną do części centralnej brodawki. b – brodawka zdeterminowana. Komórki tkanki centralnej są w podobnym stadium rozwoju (Sprent, James 2007).

Fig. 6. Schematic of nodule structure in indeterminate and determinate nodule. a – indetermined nodule. The central tissue can be divided into five adjacent zones (Vasse et al. 1990). Zone I (infection threads penetration zone) is located just below the apical meristem. In zone II (young infection zone) bacteria are released from the infection threads and cell infection begins. The interzone II/III is characterized by the presence of large amyloplasts. Intensive N_2 fixation process takes place in the nitrogen fixation zone (III). Zone IV (senescence zone) represents the region where bacteroids are degraded. The nodule is surrounded by peripheral tissues: the nodule cortex, the nodule endodermis and the nodule parenchyma. The last one forms a barrier for oxygen diffusion, which regulates amount of oxygen provided to the central part of the nodule. b – determinate nodule. The cells in the central tissue have a similar developmental stage (Sprent, James 2007).

przekształcają się w wiązające azot cząsteczkowy bakteroidy (Oke, Long 1999). W brodawkach typu zdeterminowanego merystem funkcjonuje krótko, jego komórki podlegają infekcji i w odpowiednim czasie ulega różnicowaniu w tkankę bakteroidalną, która nie wykazuje strefowości (Ryc. 6).

ENDOCYTOZA BAKTERII

Proces infekcji polega na endocytozie komórek bakteryjnych z nici infekcyjnej do cytoplazmy komórek roślinnych, które nazywamy komórkami zainfekowanymi (Albrecht et al. 1999). Infekowane są komórki nowo podzielone (Verma 1992). Bakterie uwalniane są do komórek, które posiadają dobrze rozwiniętą

sieć retikulum endoplazmatycznego oraz aparaty Golgiego, tj. struktury niezbędne do syntezy błon wykorzystywanych do tworzenia błon peribakteroidalnych (Brewin 1998).

U grochu, jak i u innych roślin motylkowatych wytwarzających brodawki korzeniowe typu niezdeteminowanego, endocytoza bakterii ma miejsce tylko ze szczytu nici infekcyjnej, pozabawionego ściany komórkowej (Brewin 1998). Najpierw rozrasta się zakończenie nici infekcyjnej, które osiąga średnicę około 10–25 μm i zawiera nawet 100 komórek bakteryjnych (Brown, Walsh 1994). Następnie są one pojedynczo wprowadzane do cytoplazmy komórek roślinnych w ten sposób, że każdą z nich otacza błona peribakteroidalna wykazująca ciągłość z błoną komórkową otaczającą nić infekcyjną

(Tajima et al. 2000). W brodawkach wspięgi wskutek łączenia się błon peribakteroidalnych i podziałów komórek bakteryjnych, w jednym pęcherzyku (symbiosomie) może występować nawet kilkanaście komórek bakteryjnych (Newcomb, McIntyre, 1981). Oprócz komórek bakteryjnych, które zajmują centralną część symbiosomu w jego skład wchodzi błona peribakteroidalna oraz przestrzeń peribakteroidalna pomiędzy bakterią a błoną (Vasse et al. 1990). Symbiosom ma charakter pęcherzyka litycznego (Brewin 1991). W przestrzeni peribakteroidalnej występuje bowiem wiele enzymów hydrolitycznych: α -mannozydazy II, α -glukozydazy, proteazy i inhibitory proteaz (Kinnback et al. 1987, Brewin 1998), kwaśne trehalazy (Mellor 1987) oraz kwaśne fosfatazy pochodzące z aparatów Golgiego (Brewin 1990). Enzymy te są charakterystyczne dla wakuol (Mellor 1987). Procesowi uwalniania bakterii z nici infekcyjnych towarzyszy podwyższony poziom aktywności bakteryjnej kwaśnej fosfatazy (Sujkowska et al. 2006). Tę aktywność zlokalizowano w zewnętrznych partiach bakterii oraz w niciach infekcyjnych. Enzym ten prawdopodobnie uczestniczy w rozluźnianiu struktury ściany nici w trakcie endocytozy bakterii do komórki gospodarza.

U prymitywnych roślin motylkowatych np. *Andira*, bakterie nie zostają uwolnione z nici do cytoplazmy i nie tworzą symbiosomów (Faria de et al. 1988). Proces wiązania azotu ma miejsce w rozbudowanych tubularnych strukturach przypominających nici (ang. *fixation threads*), które pozostają otoczone ścianą komórkową rośliny. Podobne struktury występują w brodawkach *Parasponii* (Ulmaceae) jedynej spoza rodziny motylkowatych wchodzącej w symbiozę z *Rhizobium* (Hirsch, LaRue 1998).

KONTROLA INFEKCJI

Roślina-gospodarz kontroluje liczbę zainfekowanych włośników, przestrzenne rozmieszczenie nici infekcyjnych oraz endocytozę bakterii (Gage 2004). Rośliny mogą ograniczać rozprzestrzenianie się wirusowych, bakteryjnych i grzybowych patogenów poprzez reaktywne formy

tłenu (ROS; ang. *reactive oxygen species*), takie jak: nadtlenek wodoru – H_2O_2 , anionorodnik ponadtlenkowy – O_2^- i rodnik hydroksylowy – $\cdot OH$, reaktywne formy azotu, syntezę związków fenolowych, białek obronnych, zmianę struktury ścian komórkowych oraz przez programowaną śmierć komórki (Doke et al. 1996, Greenberg 1997, Herouart et al. 2002, Able 2003). Niektóre z tych reakcji obserwuje się podczas symbiozy roślin motylkowatych z ryzobiami (Benaben et al. 1995). We wczesnych etapach procesu powstawania brodawki ma miejsce synteza ROS (Ramu et al. 2002). H_2O_2 jest wykorzystywany do tworzenia kowalencyjnych wiązań poprzecznych, wzmacniających i stabilizujących strukturę ścian komórkowych, poprzez ścienne peroksydazy (Lamb, Dixon 1997). Cook i współpracownicy (1995) wykazali, że ekspresja indukowanej przez ryzobia peroksydazy (*rip1*) zachodzi we wczesnych etapach rozwoju brodawek. Ekspresja tego genu początkowo ma miejsce w epidermie korzenia, a następnie w primordium brodawki (Cook et al. 1995).

Pierwsze doniesienia dotyczące aktywności syntazy tlenu azotu (NOS) u roślin pochodzą z badań nad brodawkami łubinu *Lupinus albus* (Cueto et al. 1996). Aktywność NOS wykryto w tkance przewodzącej brodawek i w tkance bakteroidalnej. Ponadto, wykazano, że NO hamuje aktywność nitrogenazy, a w efekcie wiązanie azotu (Meyer 1981). Nie zostało jednak wyjaśnione, jaki jest udział NO w interakcjach symbiotycznych.

Zahamowaniu wzrostu nici infekcyjnych towarzyszy reakcja nadwrażliwości (HR; ang. *hypersensitive reaction*) rośliny. W takich sytuacjach obserwuje się w komórkach obecność białek bogatych w hydroksyprolinę oraz enzymów takich jak chitynaza, amoniakoliza fenyloalaniny i syntaza chalkonu, dwa kluczowe enzymy szlaku produkcji fitoaleksyn (Hirsch 1992, Vasse et al. 1993). Zahamowanie wzrostu nici infekcyjnych obserwuje się również w kompatybilnych interakcjach symbiotycznych (Vasse et al. 1993). Pühler i współpracownicy (1991) wykazali, że w ścianach komórkowych komórek, w których zahamowany był wzrost nici

infekcyjnych występowały związki fenolowe. Akumulacja związków fenolowych w ścianie komórkowej wskazuje na jej późniejszą lignifikację. W obecności niekompatybilnych ryzobów stwierdzono syntezę fitoaleksyn (Niehaus et al. 1993), fenoli i ligniny (Peretto et al. 1994) oraz akumulację ekstensyn (Benhamou et al. 1991). Dzięki tego typu reakcjom obronnym roślina może zahamować wzrost nici infekcyjnych i kontrolować przebieg infekcji, a tym samym liczbę brodawek (Vasse et al. 1993, Gage 2004).

PODSUMOWANIE

Specyficzność symbiozy roślin motylkowatych z ryzobiami opiera się na ciągłym molekularnym dialogu pomiędzy oboma partnerami. W początkowym etapie rośliny motylkowane wydzielają flawenoidy, które uaktywniają geny *NOD* ryzobów, w efekcie czego produkowany bakteryjny czynnik Nod wywołuje skręcanie włóśników korzeniowych, podziały komórek kory i tworzenie nici infekcyjnych (Limpen, Bisseling 2003). Nici infekcyjne o unikalnej strukturze są efektem współpracy pomiędzy partnerami. Stąd wynikają trudności w badaniu udziału rośliny i bakterii w rozwoju nici infekcyjnych. Proces infekcji przez bakterie jest ściśle zależny od zahamowania reakcji obronnych rośliny-gospodarza, które mogą zahamować rozwój mikrosymbiontów w niciach infekcyjnych, a tym samym samych nici infekcyjnych, powodując przedwczesne starzenie brodawek. Wprowadzenie nowych technik badawczych pozwoli wyjaśnić, które czynniki bakteryjne i roślinne związane z tym procesem są konieczne dla funkcjonowania efektywnej symbiozy.

LITERATURA

- ABLE A. J. 2003. Role of reactive oxygen species in response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* **221**: 137–143.
- ALBRECHT C., GEURTS R., BISSELING T. 1999. Legume nodulation and mycorrhizae formation: two extremes in host specificity meet. *EMBO J.* **18**: 281–288.
- BAKHUIZEN R., VAN SPRONSEN P. C., KIJNE J. W. 1988. Cell wall degradation and infection thread initiation in pea root cortical cells during infection by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. W: R. BAKHUIZEN. The plant cytoskeleton in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. Praca doktorska wykonana w Uniwersytecie w Leiden, s. 83–107.
- BECKER A., PÜHLER A. 1998. Production of exopolysaccharides. W: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, P. J. J. HOOYKAAS. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 97–118.
- BENABEN V., DUC G., LEFEBVRE V., HUGUET T. 1995. TE7, an inefficient symbiotic mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiol.* **107**: 53–62.
- BENHAMOU N., LAFONTAINE P. J., MAZAU D., ESQUERRE-TUGAYE M. T. 1991. Differential accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in bean root nodule cells infected with a wild-type strain or C4-dicarboxylic acid mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Planta* **184**: 457–467.
- BORTHAKUR D., BARBER C. E., LAMB J. E., DANIELS M. J., DOWNIE J. A., JOHNSON A. W. B. 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *R. phaseoli* and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. *Mol. Gen. Genetics* **203**: 320–323.
- BREWEN N. J. 1990. The role of the plasma membrane in symbiosis. W: C. LARSSON, I. M. MOLLER (red.), The plant plasma membrane. Springer-Verlag, Berlin, s. 351–375.
- BREWEN N. J. 1991. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 191–226.
- BREWEN N. J. 1998. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. W: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, P. J. J. HOOYKAAS. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 417–429.
- BREWEN N. J. 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**: 293–316.
- BREWEN N. J., RAE A. L., PERETTO S., KANNENBERG E. L., RATHBUN E. A., LUCAS M. M., GUNDER A., BOLANOS L., KARDAILSKY I. V., WILSON K. E., FIRMIN J. L., DOWNIE J. A. 1994. Bacterial and plant glycoconjugates at the *Rhizobium*-legume interface. *Biochem. Soc. Symp.* **60**: 61–73.
- BROUGHTON W. J., JABBOURI S., PERRET X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641–5652.
- BROWN S. M., WALSH K. B. 1994. Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Austr. J. Plant Physiol.* **21**: 49–68.
- CALLAHAN D. A., TORREY J. G. 1981. The structural basis

- for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**: 1647–1664.
- CALVERT H. E., PENCE M. K., PIERCE M., MALIK N. S. A., BAUER W. D. 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* **62**: 2375–2385.
- CÁRDENAS L., VIDALI L., DOMINGUEZ J., PEREZ H., SANCHEZ F., HEPLER P. K., QUINTO C. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871–877.
- CASSAB G. I. 1998. Plant cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 281–309.
- CHAO H. T., KENDE H. 1998. Tissue localization of expansins in deepwater rice. *The Plant J.* **15**: 805–812.
- CHENG H. P., WALKER G. C. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**: 5183–5191.
- COMPAAAN B., YANG W. C., BISSELING T., FRANSSSEN H. 2001. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil* **230**: 1–8.
- COOK D., DREYER D., BONNET D., HOWELL M., NONY E., VANDENBOSCH K. 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**: 43–55.
- COSGROVE D. J. 1989. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* **177**: 121–120.
- COSGROVE D. J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 391–417.
- COSGROVE D. J., LI L. C., CHO H. T., HOFFMAN-BENNING S., MOORE R., BLECKER D. 2002. The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1436–1444.
- CUETO M., HERNANDEZ-PERERA O., MARTIN R., BENTURA M. L., RODRIGO J., LAMAS S., GOLVANO M. P. 1996. Presence of nitric acid synthase activity in roots and nodules. *FEBS Lett.* **398**: 159–164.
- DAZZO F. B., TRUCHET G. I., HOLLINGSWORTH R. I., HRABAK E. M., PANKRATZ H. S., PHILIP-HOLLINGSWORTH S., SALZWEDEL J. L., CHAPMAN K., APENZELLER L., SQUARTINI A. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* **173**: 5371–5384.
- D'HAENZ W., HOLSTER S. M. 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiol.* **12**: 555–561.
- DOBLIN M. S., KUREK I., JACOB-WILK D., DELMER D. P. 2002. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1407–1420.
- DOKE N., MIURA Y., SANCHEZ L. M., PARK H. J., NORITAKE T., YOSHIOKA H., KAWAKITA K. 1996. The oxidative bursts protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant biodefence. *Gene* **179**: 45–51.
- DOWNIE J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. W: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, P. J. J. HOOYKAAS. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 387–402.
- DUNLAP J., MINAMI E., BHAGWAT A. A., KEISTER D. L., STACEY G. 1996. Nodule development induced by mutants of *Bradyrhizobium japonicum* defective in cyclic β -glucan synthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 546–555.
- EHRHARDT D. W., WAIS R., LONG S. R. 1992. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**: 673–681.
- ESSELING J. J., LHUISSIER F. G. P., EMONS A. M. C. 2004. A non-symbiotic root hair growth tip phenotype in NORK-mutated legumes: implications for Nod factor-induced signalling and formation of multi-faceted root hair pockets for bacteria. *Plant Cell* **16**: 933–966.
- FARIA S. M. DE, HAY H. T., SPRENT J. I. 1988. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2291–2296.
- FARIA S. M. DE, SUTHERLAND J. M., SPRENT J. I. 1986. A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp. (Leguminosae). *Plant Sci.* **45**: 143–147.
- FEDOROVA E., THOMSON R., WHITEHEAD L. F., MAUDOUX O., UUDVARDI M. K., DAY D. A. 1999. Localization of H⁺-ATPase in soybean root nodules. *Planta* **209**: 25–32.
- FELLE H. H., KONDOROSI I., KONDOROSI A., SCHULTZE M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**: 455–464.
- FLEMETAKIS E., EFROSE R. C., DESBROSSES G., DIMOU M., DELIS C., AIVALAKIS G., UDVARDI M. K., KATINAKIS P. 2004. Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**: 1283–1293.
- FRAYSSE N., COUDERC F., POINSOT V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365–1380.
- FRUHLING M., HOHNJEC N., SCHRODER G., KUSTER H., PUHLER A., PERLICK A. M. 2000. Genomic organization and expression properties of the VfENOD5 gene from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci.* **155**: 169–178.
- GAGE D. J. 2002. Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **178**: 7042–7046.
- GAGE D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of

- temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 280–300.
- GAMAS P., NIEBEL F. D., LESCURE N. 1996. Use of subtractive hybridization to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 233–242.
- GARDNER C. D., SHERRIER D. J., KARDAILSKY I. V., BREWIN N. J. 1996. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: identification of lipoxygenase in the lumen of infection threads. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 282–289.
- GEURTS R., BISSELING T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell*. 239–249. Supplement
- GEURTS R., FEDOROVA E., BISSELING T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 346–352.
- GIORDANO W., HIRSCH A. M. 2004. The expression of MaEXP1, a *Melilotus alba* expansion gene, is upregulated during the sweetclover-*Sinorhizobium meliloti*-interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 613–622.
- GONZALES J. E., YORK G. M., WALKER G. C. 1996. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. *Gene* **179**: 141–146.
- GRAY J. X., ROLFE B. G. 1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol.* **4**: 1425–1431.
- GREENBERG J. T. 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 525–545.
- GUALTERI G., BISSELING T. 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 181–194.
- HADRI E. A., BISSELING T. 1998. Responses of the plant to Nod factor. W: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, P. J. J. HOOYKAAS. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 403–416.
- HADRI A. E., SPAINK H. P., BISSELING T., BREWIN N. J. 1998. Diversity of root nodulation and Rhizobial infection processes. W: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, P. J. J. HOOYKAAS. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 347–360.
- HAYASHI M., IMAIZUMI-ANRAKU H., AKAO S., KAWAGUCHI M. 2000. Nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* **113**: 489–495.
- HEROUART D., BAUDOIN E., FREDO P., HARRISON J., SANTOS R., JAMET A., VAN DE SYPE G., TOUATI D., PUPPO A. 2002. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 619–624.
- HIGASHI S., KUSHIYAMA K., ABE M. 1987. Electron microscopic observations of infection threads in driselase treated nodules of *Astragalus sinicus*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 947–952.
- HIRSCH A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211–237.
- HIRSCH A. M., LARUE T. A. 1998. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 361–392.
- HIRSCH A. M., LUM M. R., DOWNIE J. A. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Physiol.* **127**: 1484–1492.
- JANCZAREK M., KRÓL J., MAZUR A., KUTKOWSKA J., WIELBO A., BORUCKI W., KOPCIŃSKA J., ŁOTOCKA B., URBANIK-SYPNIEWSKA T., SKORUPSKA A. 2001. Mutation in the pssB-pssA intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability. *J. Plant Physiol.* **158**: 1565–1574.
- JOURNET E. P., EL GACHTOULI N., VERNOUD V., DE BILLY F., PICHON M., DEDIEU A., ARNOULD C., MORANDI D., BARKER D. G., GIANINAZZI-PEARSON V. 2001. *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 737–748.
- KIJNE J. W., BAUCHROWITZ M. A., DIAZ C. L. 1997. Root lectins and rhizobia. *Plant Physiol.* **115**: 869–873.
- KINNBAC A., MELLOR R. B., WERNER D. 1987. α -Mannosidase II isoenzyme in the peribacteroid space of *Glycine max* root nodules. *J. Exp. Bot.* **38**: 1373–1377.
- LAMB C., DIXON R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–275.
- LAURENZI M., TIPPING A. J., MARCUS S. E., KNOX J. P., FEDERICO R., ANGELINI R., MC PHERSON M. J. 2001. Analysis of the distribution of copper amine oxidase in cell walls of legume seedlings. *Planta* **214**: 37–45.
- LI Y., DARLEY C. P., ONGARO V., FLEMING A., SCHIPPER O., BALDAUF S., MCQUEEN-MASON S. J. 2002. Plant expansions are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.* **128**: 854–864.
- LIMPENS E., BISSELING T. 2003. Signaling in symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 343–350.
- LIMPENS E., FRANKEN C., SMIT P., WILLEMSE J., BISSELING T., GEURTS R. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633.
- LJUNGGREN H., FAHRAEUS G. 1961. The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 521–528.
- LUGTENBERG B. J. J., DIAZ C., SMIT G., DE PATER S., KIJNE J. W. 1990. Role of lectin in the *Rhizobium*-legume

- symbioses. W: H. HENNECKE, D. P. S. VERMA (eds.), *Advances in molecular genetics of plant-microbe interaction*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, s. 174–181.
- LOTOCKA B., KOPCINSKA J., GORECKA M., GOLINOWSKI W. 2000. Formation and abortion of root nodule primordia in *Lupinus luteus* L. *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.* **42**: 87–102.
- MADSEN E. B., MADSEN L. H., RADUTOIU S., OLBRYT M., RAKWALSKA M., SZCZYGLOWSKI K., SATO S., KANEKO T., TABATA S., SANDAL N., STOUGAARD J. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637–640.
- MATHESIUS U., WEINMAN J. J., ROLFE B. G., DJORDJEVIC M. A. 2000. Rhizobia can induce nodules in white clover by „hijacking” mature cortical cells activated during lateral root development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 170–182.
- MCQUEEN-MASON S. J., COSGROVE D. J. 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* **107**: 87–100.
- MCQUEEN-MASON S. J., DURACHKO D. M., COSGROVE D. J. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* **4**: 1425–1433.
- MELLOR R., WERNER D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis* **3**: 89–114.
- MEYER J. 1981. Comparison of carbon monoxide, nitric oxide, and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 246–256.
- MILLER D. D., DE RUIJTER N. C. A., BISSELING T., EMONS A. M. C. 1999. The role of actin in root hairs morphogenesis: studies with lipochitoooligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* **17**: 141–154.
- MORALES V. M., MARTINEZ-MOLINA E., HUBBELL D. H. 1984. Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant Soil* **80**: 407–416.
- MUNOZ J. A., CORONADO C., PEREZ-HORMAECH E. J., KONDOROSI A., RATET P., PALOMARES A. J. 1998. MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9687–9692.
- MYLONA P., PAWLOWSKI K., BISSELING T. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**: 869–885.
- NEWCOMB W., MCINTYRE L. 1981. Development of root nodules of mung bean (*Vigna radiata*): a reinvestigation of endocytosis. *Can. J. Bot.* **5**: 2478–2499.
- NEWCOMB W., SIPPEN D., PETERSON R. L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**: 2603–2616.
- NIEHAUS K., KAPP D., PÜHLER A. 1993. Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by expolysaccharide (EPS-I) deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* **190**: 415–425.
- NOEL K. D., VANDENBOSCH K. A., KULPACA B. 1986. Mutation in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* **168**: 1393–1401.
- OKAZAKI S., NUKUI N., SUGAWARA N., MINAMISAWA K. 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane –1-carboxylate deaminase. *Microbe Environ.* **19**: 99–111.
- OKE V., LONG S. R. 1999. Bacteroids formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 641–646.
- OLDROYD G. E. D., DOWNIE J. A. 2004. Calcium, kinase and nodulation signalling in legumes. *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 566–576.
- OLDROYD G. E. D., ENGSTROM E. M., LONG S. R. 2001. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**: 1835–1849.
- PARNISKE M., DOWNIE J. A. 2003. Locks, keys and symbiosis. *Nature* **425**: 569–570.
- PATRIARCA E. J., TATE R., FERRAIOLI S., IACCARINO M. 2004. Organogenesis of legume root nodule. *Inter. Rev. Cytol.* **234**: 201–261.
- PAWLOWSKI K., BISSELING T. 1996. Rhizobial and actin-orthizal symbiosis: what are the shared features. *Plant Cell* **8**: 1899–1913.
- PELLOCK B. J., CHENG H. P., WALKER G. C. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* **182**: 4310–4318.
- PERETTO S., BREWIN N., KANNENBERG E. L. 1994. Cytological evidence for a host-defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 99–112.
- PRIEFER U. B. 1989. Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* **171**: 6161–6168.
- PÜHLER A., ARNOLD W., BUENDIA-CLAVERIA A., KAPP D., KELLER M., NIEHAUS K., QUANT J., ROXLAU A., WENG W. M. 1991. The role of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides EPS I and EPS II in the infection process of alfalfa nodules. W: H. HENNECKE, D. P. S. VERMA (eds.), *Advances in molecular genetics of plant-microbe interaction*. 1, s. 189–194.
- RADUTOIU S., MADSEN L. H., MADSEN E. B., FELLE H.

- H., UMEHARA Y., GRONLUND M., SATO S., NAKAMURA Y., TABATA S., SANDAL N., STOUGAARD J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptors-like kinases. *Nature* **425**: 585–592.
- RAE A. L., BONFANTE-FASOLO P., BREWIN N. J. 1992. Structure and growth of infection threads in legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J.* **2**: 385–392.
- RAMU S. K., PENG H. M., COOK D. R. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species is correlated with expression of the early nodulin gene *rp1* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 522–528.
- RATHBUN E. A., NALDRETT M. J., BREWIN N. J. 2002. Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 350–359.
- SANTOS R., HEROUART D., SIGAUD S., TOUATI D., PUPPO A. 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 86–89.
- SCHERES B., VAN EENGELEN F., VAN DER KNAAP E., VAN DE WEIL C., VAN KAMMEN A., BISSELING T. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**: 687–700.
- SHAW S. L., LONG S. R. 2003. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol.* **132**: 2196–2204.
- SHERRIER D. J., VANDENBOSCH K. A. 1994. Localization of repetitive proline-rich proteins in the extracellular matrix of pea nodules. *Protoplasma* **183**: 148–161.
- SKORUPSKA A., BIALEK U., URBANIK-SYPNIEWSKA T., VAN LAMMEREN A. 1995. Two types of nodules induced on *Trifolium pratense* by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* deficient in exopolysaccharide production. *J. Plant Physiol.* **147**: 93–100.
- SKORUPSKA A., JANCZAREK M., MARCZAK M., MAZUR A., KRÓL J. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Factor* **5**: 7–25.
- SMIT G., SWART S., LUGTENBERG B. J., KIJNE J. W. 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* **6**: 2897–903.
- SMIT P., LIMPENS E., GEURTS R., FEDOROVA E., DOLGIKH E., GOUGH C., BISSELING T. 2007. *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.* **145**: 183–191.
- SMITH C. A., SKVRIRSKY R. C., HIRSCH A. M. 1989. Histochemical evidence for the presence of a suberinlike compound in *Rhizobium*-induced nodules of the nonlegume *Parasponia*. *Can. J. Bot.* **64**: 1474–1484.
- SPRENT J. I., JAMES E. K. 2007. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol.* **144**: 575–581.
- SZCZYGLOWSKI K., SHAW R. S., WOPEREIS J., COPELAND S., HAMBURGER D., KOSIBORSKI B., DAZZO F. B., DE BRUIJN F. J. 1998. Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model Legume *Lotus japonicus*. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **11**: 684–697.
- SUJKOWSKA M., BORUCKI W., GOLINOWSKI W. 2006. Localization of acid phosphatase activity in the apoplast of root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Soc. Bot. Pol.* **75**: 33–38.
- SUJKOWSKA M., BORUCKI W., GOLINOWSKI W. 2007. Localization of expansin-like protein in apoplast of pea (*Pisum sativum* L.) root nodules during interaction with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248. *Acta Soc. Bot. Pol.* **76**: 17–26.
- TAJIMA S., TAKANE K., NOMURA M., KOUCHI H. 2000. Symbiotic nitrogen fixation at the late stage of nodule formation in *Lotus japonicus* and other legume plants. *J. Plant Res.* **113**: 467–473.
- TIMMERS A. C. J., AURIAC M. C., TRUCHET G. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**: 3617–3628.
- TIMMERS A. C. J., AURIAC M. C., DE BILLY F., TRUCHET G. 1998. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**: 339–349.
- UHEDA E., DAIMON H., YOSHIZAKO F. 2001. Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by *guA*-marked *Bradyrhizobium* sp. *Can. J. Bot.* **79**: 733–738.
- VAN BRUSSEL A. A. N., BAKHUIZEN R., VAN SPRONSEN P. C., SPAIN H. P., TAK T., LUGTENBERG B. J., KIJNE J. W. 1992. Induction of pre-infection threads structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**: 70–72.
- VAN SPRONSEN P. C., BAKHUIZEN R., VAN BRUSSEL A. A. N., KIJNE J. 1994. Cell-wall degradation during infection thread formation by the root-nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a 2-step process. *Eur. J. Cell Biol.* **64**: 88–94.
- VAN WORKUM W. A. T., VAN BRUSSEL A. A. N., TAK T., WIJFFELMAN C. A., KIJNE J. W. 1995. Ethylene prevents nodulation of *Vicia sativa* ssp. *nigra* by exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 290–301.
- VANDENBOSCH K. A., DESMOND J. B., KNOX J. P., PERETTO S., BUTCHER W. G., BREWIN N. J. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical

- analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO J.* **8**: 335–342.
- VASSE J., DE BILLY F., TRUCHET G. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti* – alfalfa symbiotic interaction is accompanied by hypersensitive reaction. *Plant J.* **4**: 555–566.
- VASSE J., DE BILLY F., CAMUT S., TRUCHET G. 1990. Correlation between ultrastructural of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**: 4295–4306.
- VERMA D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**: 373–382.
- VERNOUD V., JOURNET E. P., BARKER D. G. 1999. MtENOD20, a Nod factor-inducible molecular marker for root cortical cell activation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**: 604–614.
- VIPREY V., DEL GRECO A., GOLINOWSKI W., BROUGHTON W. J., PERRET X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* **28**: 1381–1389.
- WALKER S. A., DOWNIE J. A. 2000. Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires nod0 or nodE. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 754–762.
- WILSON R. C., LONG F., MARUOKA E. M., COOPER J. B. 1994. A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* **6**: 1265–1275.
- WISNIEWSKI J. P., RATHBUN E. A., KNOX J. P., BREWIN N. J. 2000. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 413–420.
- WU Y. J., QUI X., DU S., ERICKSON L. 1996. Cloning and characterization of PO22, a pollen-expressed gene in alfalfa. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1205–1207.
- YENNAWAR N. H., CHAO-LIAN L., DUDZINSKI D. M., TABUCHI A., COSGROVE D. J. 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *PNAS* **103**: 14664–14671.
- ZORREGUIETA A., FINNIE C., DOWNIE A. 2000. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. *J. Bacteriol.* **182**: 1304–1312.