

STRUKTURA I FUNKCJONOWANIE BRODAWEK KORZENIOWYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Structure and functioning of legume root nodules

Wojciech BORUCKI

Summary. Legume root nodule organogenesis and functioning are described. Nodule is viewed as a set of compartments. Nodule is composed of cortex and bacteroidal tissue both derived from meristem. Within cortex and bacteroidal tissue some subcompartments exist functioning of which is tightly connected with nitrogen fixation. There are some constraints in nodule structure as bacteroid nitrogenase is an oxygen sensitive enzyme and on the other hand nitrogen fixation is a highly energy-consuming process. Oxygen diffusion barrier (present in nodule cortex?) and fine control of oxygen concentration within infected cells form a niche for bacteroids. Bacteroids can metabolise microaerobically and consume large amount of oxygen.

Bacteroidal tissue is composed of infected and uninfected cells or infected cells only. Infected cells contain numerous symbiosomes that can be regarded as new intracellular compartment. Uninfected cells can be specialised metabolically and probably are spatially distributed within bacteroidal tissue in such a way that produces large surface of contact with infected cells.

Relationships between plant development, bacteroid differentiation and nitrogen fixation are also presented. Nodule functioning under stress conditions and energy cost of nitrogen fixation are of interest as well.

Key words: root nodule, bacteroidal tissue, cell differentiation, bacteroids, nitrogen fixation.

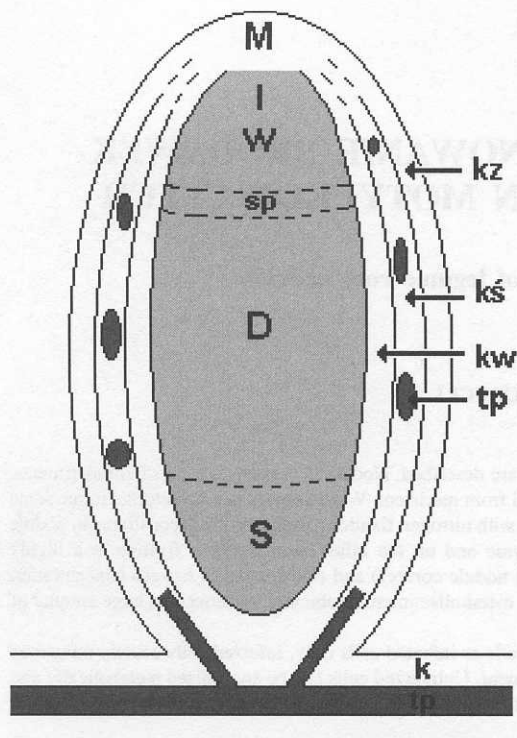
Dr Wojciech Borucki, Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Rakowiecka 26/30, 02–528 Warszawa.

WSTĘP

Brodawka korzeniowa roślin motylkowatych jest organem o złożonej strukturze anatomicznej i cytologicznej, którego funkcją jest przyswajanie azotu cząsteczkowego. Inicjacja tego organu zachodzi w wyniku wymiany cząsteczek sygnałowych pomiędzy rośliną i bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* bądź *Azorhizobium*, określanymi dalej jako rizobia. Korzenie roślin motylkowatych wydzielają flawonoidy, które uaktywniają geny *nod* rizobiów. W efekcie rizobia produkują czynnik nod będący lipooligochitozanem. Indukuje on podziały komórkowe w korze pierwotnej korzenia [70, 112]. Następnie nowo podzielone komórki są infekowane bakteriami z rozwijającej się w ich pobliżu nici infekcyjnej [135]. Proces infe-

kcji polega na endocytozie komórek bakteryjnych z nici infekcyjnej do cytoplazmy komórek roślinnych, które nazywamy komórkami zainfekowanymi. W jej wyniku każda bakteria zamknięta jest w pęcherzyku otoczonym membraną peribakteroidalną, pochodzącą od membrany otaczającej nić infekcyjną [78]. W ten sposób potencjalnie patogeniczne rizobia [121] odseparowywane są od cytoplazmy gospodarza, chociaż poprzez membranę peribakteroidalną są z nią ściśle powiązane funkcjonalnie.

Kolejny etap rozwoju brodawki polega na skoordynowanym różnicowaniu się komórek roślinnych i bakteryjnych. Jego efektem jest dopasowanie struktury, metabolizmu oraz funkcji komórek gospodarza i komórek bakterii, przekształcających się w bakteroidy zdolne do wiązania azotu. W wyniku tych zmian dojrzałe ko-



Ryc.1. Schemat brodawki niezdeterminowanej. Kora brodawki: kz – kora zewnętrzna, ks – kora środkowa, kw – kora wewnętrzna. M – merystem brodawki. Tkanka bakteroidalna: I – strefa infekcji, W – wczesna symbioza, sp – strefa przejściowa, D – dojrzała symbioza, S – strefa starzenia się tkanki bakteroidalnej. k – kora korzenia. tp – tkanka przewodząca.

Fig. 1. Schematic representation of indeterminate nodule. Nodule cortex: kz – outer cortex, ks – middle cortex, kw – inner cortex. M – nodule meristem. Bacteroidal tissue: I – infection zone, W – early symbiosis, sp – interzone, D – mature symbiosis, S – senescence zone. k – root cortex. tp – vascular tissue.

mórki gospodarza zawierają dojrzałe bakteroidy, co warunkuje zdolność symbiozy do redukcji azotu cząsteczkowego, określaną także jako jej efektywność.

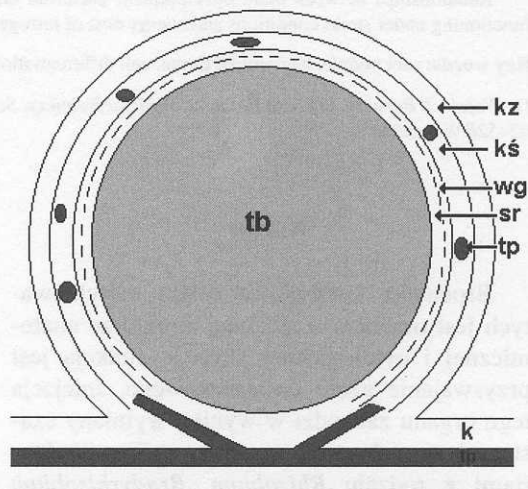
Bakteroidy zawierają nitrogenazę, tj. enzym odpowiedzialny za wiązanie azotu cząsteczkowego, który ulega inaktywacji w obecności tlenu [153]. Dlatego, wewnątrz brodawki jest utrzymywane bardzo niskie stężenie tlenu [156]. Jednocześnie przyswajanie azotu cząsteczkowego wymaga dostarczenia dużych ilości energii

[101]. Te zupełnie sprzeczne cele osiągnięte zostały w brodawce korzeniowej dzięki obecności bariery dyfuzyjnej dla tlenu [117], leghemoglobinie wiążącej tlen i właściwościom bakteroidów, które mimo znacznie obniżonego stężenia tlenu, charakteryzują się dużą intensywnością oddychania tlenowego [154].

TYPY BRODAWEK KORZENIOWYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Brodawki powstające na korzeniach roślin motylkowatych w wyniku infekcji bakteriami z rodzaju (*Brady*)*rhizobium*, dzielimy na trzy główne grupy biorąc pod uwagę ich kształt, aktywność merystemu oraz rodzaj substancji azotowej jaką eksportują. Są to brodawki: niezdeterminowane, zdeterminowane oraz kołnierzykowate.

Brodawki niezdeterminowane (Ryc. 1) są często kształtu cylindrycznego. Ich merystem może funkcjonować przez cały sezon wegeta-



Ryc. 2. Schemat brodawki zdeterminowanej. Kora brodawki: kz – kora zewnętrzna, ks – kora środkowa, wg – warstwa graniczna i sr – strefa rozdzielająca (części kory wewnętrznej). tb – tkanka bakteroidalna. k – kora korzenia. tp – tkanka przewodząca.

Fig. 2. Schematic representation of determinate nodule. Nodule cortex: kz – outer cortex, ks – middle cortex, wg – boundary layer and sr – distributing zone (parts of inner cortex). tb – bacteroidal tissue. k – root cortex. tp – vascular tissue.

cyjny. Tkanka bakteroidalna tych brodawek charakteryzuje się strefowością. Polega ona na tym, że obok niedojrzałej tkanki bakteroidalnej występuje także dojrzała. Zakończenia wiązek przewodzących tych brodawek ciągle rozrastają się tworząc system otwarty. Brodawki niezde-terminowane eksportują związany azot w postaci amidów (lucerna, groch, wyka – [71, 83, 85, 114, 122]).

Brodawki zdeterminowane (Ryc. 2) mają najczęściej kształt sferyczny, a ich merystem funkcjonuje zaledwie kilka dni. Młode komórki zainfekowane tych brodawek dzielą się. Tkanka bakteroidalna brodawek zdeterminowanych nie wykazuje strefowości. Ich wiązki przewodzące tworzą system zamknięty (brak wolnych zakończeń tych wiązek), a związany azot eksportują w postaci ureidów (soja – [85, 125]).

Brodawki kołnierzykowate (Ryc. 3) obrastają korzeń, a ich merystem funkcjonuje przez cały sezon wegetacyjny. Młode komórki zainfekowane tych brodawek dzielą się. Ich tkanka ba-

akteroidalna charakteryzuje się strefowością, a związany azot eksportują w postaci amidów (łubin – [41]).

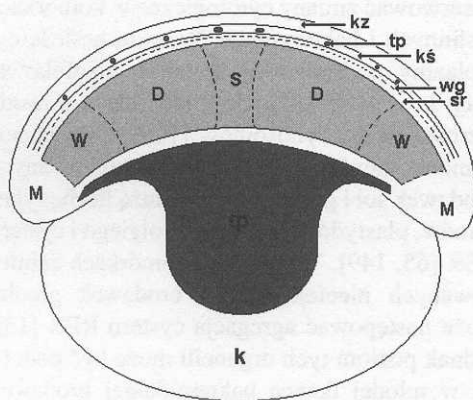
ROZWÓJ TKANKI BAKTEROIDALNEJ

MERYSTEM BRODAWKI

Komórki merystematyczne brodawek soi nie są zróżnicowane pod względem ultrastruktury i przypominają generalnie komórki merystemu wierzchołkowego korzenia [88]. Komórki merystematyczne brodawek komonicy posiadają duże jądra oraz liczne, małe wakuole, a więc cechy typowe dla tego rodzaju komórek. Figurem mitotycznym widocznym tylko we wczesnych etapach rozwoju tych brodawek, towarzyszą nici infekcyjne [129]. Nie stwierdzono różnic w budowie merystemów brodawek efektywnych i nieefektywnych lucerny utworzonych przez mutanty roślinne lub bakteryjne [125, 126].

Zewnętrzne partie merystemu brodawek grochu zbudowane są z komórek diploidalnych, które dzieląc się dają korę zewnętrzną. W centralnej części tego merystemu znajdują się komórki tetraploidalne, których pochodne tworzą korę wewnętrzną i tkankę bakteroidalną [81]. Merystem brodawki łubinu jest początkowo miksploidalny, a następnie ulega przekształceniu w diploidalny [89]. Zatem ploidalność komórek merystemu zależy od typu brodawki. Otwarte jednak pozostaje pytanie czy w merystemie brodawki grochu istnieją osobne komórki inicjalne kory zewnętrznej, kory wewnętrznej oraz tkanki bakteroidalnej? Nie wiadomo także, w jaki sposób komórki merystematyczne brodawek unikają zainfekowania? Przypuszcza się, że małe rozmiary tych komórek i związość ich układu, a także brak regularnego planu podziałów sprawiają, że są one "odporne" na rozwój nici infekcyjnej [17].

Do merystemu brodawek niezde-terminowanych przylega strefa penetracji nici infekcyjnej, w której część komórek będących pochodnymi merystemu jest infekowana, a część pozostaje wolna od bakterii. Powstałe w ten sposób komórki zainfekowane i przylegające do nich ko-



Ryc. 3. Schemat brodawki typu kołnierzykowatego. Kora brodawki: kz – kora zewnętrzna, ks – kora środkowa, wg – warstwa graniczna i sr – strefa rozdzielająca (części kory wewnętrznej). M – merystem brodawki. Tkanka bakteroidalna: W – wczesna symbioza, D – dojrzała symbioza, S – strefa starzenia się tkanki bakteroidalnej. k – kora korzenia. tp – tkanka przewodząca.

Fig. 3. Schematic representation of collar nodule. Nodule cortex: kz – outer cortex, ks – middle cortex, wg – boundary layer and sr – distributing zone (parts of inner cortex). M – nodule meristem. Bacteroidal tissue: W – early symbiosis, D – mature symbiosis, S – senescence zone. k – root cortex. tp – vascular tissue.

mórki niezainfekowane nie mają już zdolności do podziałów. Natomiast komórki zainfekowane i niezainfekowane brodawek zdeterminowanych różnicują się z komórek zlokalizowanych w centrum merystematycznego zawiązka brodawki. Potem wzrost objętości tkanki bakteroidalnej takich brodawek wynika już tylko z powiększania się jej komórek [123, 135].

ENDOCYTOZA BAKTERII I NIEDOJRZAŁA SYMBIOZA

Dotychczas nie stwierdzono, aby komórki będące w okresie mitozy podlegały procesowi infekcji [84, 129]. Tylko komórki nowopodzielone są infekowane [135]. Badania autora dowodzą, że w merystemie brodawek grochu zachodzą podziały nierówne. Powstające po takich podziałach duże komórki potomne infekowane są bakteriami, podczas gdy mniejsze prawdopodobnie różnicują się w komórki niezainfekowane [13, 14].

Endocytozę bakterii przeprowadzają komórki roślinne zlokalizowane tuż pod merystemem. Najpierw rozrasta się zakończenie nici infekcyjnej, które osiąga średnicę około 10–25 μm i zawiera nawet 100 komórek bakteryjnych [18]. Potem są one pojedynczo wprowadzane do cytoplazmy komórek roślinnych w ten sposób, że każdą z nich otacza membrana peribakteroidalna wykazująca ciągłość z plazmolemmą otaczającą nic infekcyjną [129]. W brodawkach wspięgi (*Vigna radicata*), wskutek łączenia się membran peribakteroidalnych oraz podziałów komórek bakteryjnych, w jednym pęcherzyku (symbiosomie) może być nawet piętnaście komórek bakteryjnych [84]. W nieefektywnych brodawkach grochu indukowanych zmutowanym szczepem *Rhizobium leguminosarum* 1019, bakterie uwalniane z nici infekcyjnej nie zawsze są otaczane przez membranę peribakteroidalną, czego nie obserwuje się w brodawkach efektywnych [86].

W brodawkach lucerny powstałych po infekcji nieefektywnym (brak wiązania N_2) szczepem *R. meliloti* 102F26, endocytywane bakterie są wprawdzie zamykane przez kompletną membranę peribakteroidalną, ale zatopione w polisacharydowej matriks (fragment nici infekcyj-

nej) nie przekształcają się w bakteroidy [128]. Natomiast w efektywnych brodawkach lucerny bakterie uwalniane z nici infekcyjnej są ściśle otaczane przez membranę peribakteroidalną (brak tej matriks) i różnicują się stopniowo w bakteroidy [128].

Uważa się, że następstwem endocytozy bakterii jest endopoliploidyzacja i powiększanie się rozmiarów komórek zainfekowanych. Stwierdzono bowiem, że brak jest endopoliploidyzacji, gdy bakterie pozostają w niciach infekcyjnych w okresie rozwoju brodawki. Należy podkreślić, że brak endocytozy bakterii nie wpływa na anatomię tych brodawek [118]. Jednak zarówno komórki diploidalne, jak i poliploidalne mogą być infekowane, a zatem wzrost zawartości DNA w komórce może następować jeszcze przed jej zainfekowaniem [89]. U niektórych strączkowych, np. *Andira* sp., komórki roślinne nie dokonują endocytozy bakterii. Wówczas rizobia przekształcają się w niciach infekcyjnych w formy wiążące azot [34].

W strefie niedojrzałej symbiozy można zaobserwować zmiany cytologiczne w komórkach roślinnych i bakteryjnych. Wzrasta gęstość cytoplazmy podstawowej komórek zainfekowanych brodawek komonicy, lecz nie z powodu wzrostu liczby rybosomów [129]. Cytoplazma komórek zainfekowanych i niezainfekowanych brodawek soi i grochu zawiera dużą liczbę rybosomów, plastydów, aparatów Golgiego i cystern RER [65, 149]. W młodych komórkach zainfekowanych nieefektywnych brodawek grochu może następować agregacja cystern RER [13]. Jednak poziom tych organelli może być podobny w młodej tkance bakteroidalnej brodawek efektywnych i nieefektywnych [84, 99].

Jednym z objawów różnicowania się młodej tkanki bakteroidalnej jest też gromadzenie skrobi w jej komórkach. Młode komórki zainfekowane brodawek gromadzą znikome ilości skrobi (komonica – [129]), bądź zapasy tej substancji są znaczne (lucerna – [55]).

DOJRZAŁA SYMBIOZA

Dojrzewanie tkanki bakteroidalnej objawia się zmianami struktury komórek gospodarza i bakterii, które zależą od gatunku rośliny-gospo-

darza i/lub bakterii, a także od stopnia efektywności symbiozy. Komórki zainfekowane mogą być zwakuolizowane (groch [13, 14]) lub wakuole mogą zanikać (lubin [41, 42]). Komórki niezainfekowane tkanki bakteroidalnej są zawsze silnie zwakuolizowane [14].

Badania mało efektywnej symbiozy (mała intensywność wiązania azotu) pomiędzy azjatycką nieuprawianą odmianą soi, zwaną Peking a *Rhizobium fredii* QB 1130 dowiodły, że w komórkach niezainfekowanych brodawek gromadziły się duże zapasy skrobi [72]. Stwierdzono ponadto, że zapasy skrobi w komórkach niezainfekowanych brodawek soi utrzymują się nawet do czterdziestego dnia po infekcji [151]. Natomiast w brodawkach efektywnych zapasy te są w dużej mierze zużywane [133, 149].

Kształt komórek tkanki bakteroidalnej jest jednym z parametrów pozwalających na odróżnienie symbioz efektywnych od nieefektywnych. W przeciwieństwie do brodawek nieefektywnych, komórki niezainfekowane brodawek efektywnych soi są ściskane przez komórki zainfekowane będące w pełnym turgorze [151].

Im większa jest efektywność symbiozy, tym większa jest liczba bakteroidów przypadająca na jedną komórkę zainfekowaną [53]. Jednocześnie w miarę dojrzewania komórek zainfekowanych efektywnych brodawek lucerny, grochu i soi zmniejsza się liczba aparatów Golgiego i cyster RER [53, 65]. Natomiast w komórkach zainfekowanych nieefektywnych brodawek lucerny wzrasta liczba aparatów Golgiego i cyster RER [53].

W przeciwieństwie do komórek zainfekowanych brodawek nieefektywnych soi, w takich samych komórkach brodawek efektywnych zaobserwowano ściśle przyleganie mitochondriów do plastydów [148, 149, 151]. Nie jest to jednak uniwersalny wskaźnik efektywności, bowiem we wczesnych i późnych etapach rozwoju efektywnych i nieefektywnych brodawek grochu, mitochondria i plastidy często są w ścisłym kontakcie [14].

W stosunku do niedojrzałych bakteroidów brodawek efektywnych, dojrzałe charakteryzują się między innymi powiększonymi rozmiarami (w brodawkach lucerny osiągają 8 μm długo-

ści), pleomorfizmem, zwiększoną zawartością DNA oraz utratą zdolności dzielenia się [53]. Posiadają one także aktywną nitrogenazę. Powstający w nich NH_4^+ wydzielają do cytoplazmy komórek gospodarza, gdzie wykorzystywany jest do syntezy organicznych związków azotowych [94]. Cytoplazma dojrzałych bakteroidów efektywnych brodawek lucerny charakteryzuje się dużą heterogennością wynikającą z kondensacji kwasów nukleinowych [53] oraz z nagromadzenia się rybosomów [133]. Heterogenność cytoplazmy charakteryzuje tylko bakteroidy zdolne do wiązania azotu. Takie bakteroidy występują w ściśle określonym regionie histologicznym brodawek lucerny, tj. dystalnej części dojrzałej tkanki bakteroidalnej [133]. Z kolei w cytoplazmie bakteroidów efektywnych brodawek grochu występują struktury obłonione (spłaszczone pęcherzyki przypominające swym kształtem cysterny ER), przyjmujące formę pierścieniową [14]. Bakteroidy efektywnych brodawek soi gromadzą ziarna polibetahydroksymaślanu (PHB) i granule polifosforanów [149], podczas gdy w efektywnych brodawkach lucerny ziarna PHB zanikają [53]. Z kolei w nieefektywnych brodawkach soi ziarna PHB gromadzone są tylko przez niedojrzałe bakteroidy i są prawie nieobecne w dojrzałych bakteroidach [151]. Natomiast bakteroidy mniej efektywnej symbiozy komonicy z *Rhizobium loti* zawierają mniej ziaren PHB, aniżeli efektywnej symbiozy powstałej z udziałem *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* [157]. Zatem na podstawie obecności lub braku ziaren PHB w bakteroidach można niekiedy odróżnić symbiozy efektywne od nieefektywnych.

Bakteroidy egzystują prawdopodobnie w stresie środowiskowym, gdyż syntetyzują białko stresu [20]. Zaobserwowano także zmiany w składzie bakteroidowych lipopolisacharydów (LPS), analogicznie do stwierdzonych w hodowli wolnożyjących bakterii narażonych na niskie pH i niskie stężenie tlenu [62]. W stosunku do bakterii wolnożyjących, bakteroidy odznaczają się także modyfikacją łańcucha oddechowego, dzięki której oddychają tlenowo, mimo bardzo niskiego stężenia tlenu w brodawce [1, 2].

STARZENIE SIĘ TKANKI BAKTEROIDALNEJ

W przypadku brodawek powstałych przy współudziale szczepów bakteryjnych niezdolnych do wiązania azotu (fix-), tkanka bakteroidalna starzeje się nie osiągnąwszy dojrzałości [67, 133]. Przypomina to relacje roślina/patogen, w których patogen po wnikięciu do komórek gospodarza indukuje w nich reakcję obronną [121].

Nie są znane czynniki zapoczątkowujące starzenie się efektywnej tkanki bakteroidalnej. Sugeruje się, że może być ono wynikiem: (1) braku substancji odżywczych, (2) regulacji hormonalnej, (3) akumulacji substancji toksycznych [64]. Nie wyjaśniono, dlaczego tkanka bakteroidalna może funkcjonować przez kilka zaledwie tygodni, podczas gdy okres wegetacji roślin motylkowatych jest o wiele dłuższy?

Śmierć komórek roślinnych związana jest z: reakcją obronną na infekcję, tworzeniem się kanałów powietrznych (np. łodygi wielu traw) i lizygenowych zbiorników olejków eterycznych (owoce cytrusowe), a także jest następstwem procesów różnicowania się komórek (człony naczyni, sklerenchyma, korek). Są to przykłady tzw. śmierci zaprogramowanej komórek roślinnych [61]. Zarówno komórki roślinne, jak i występujące w nich bakteroidy podlegają lizie. Śmierć tych komórek może być następstwem procesów starzenia się, różnicowania się lub spóźnioną reakcją obronną na infekcję rizobiami. Zatem nie jest pewne, czy procesy prowadzące do śmierci komórek tkanki bakteroidalnej można określać jako „starzenie się” tych komórek. W szczególności nie wiadomo, czy liza komórek w starzejącej się efektywnej i nieefektywnej tkance bakteroidalnej wynikają z tych samych przyczyn.

Produkty lizy komórek tkanki bakteroidalnej nie są roślinie niezbędne, gdyż może ona żyć asymbiotycznie na pełnej pożywce mineralnej. Są one jednak podłożem, w którym namnażają się saprofitycznie bakterie symbiotycznie, co zwiększa ich liczebność w glebie.

Starzeniu się komórek zainfekowanych poświęcono najwięcej uwagi. Stwierdzono, że podlegają mu symbiosomy, a także cytoplazma

komórek gospodarza. Symbiosom może stać się przedziałem komórki o właściwościach lizosomu. Jest to spowodowane nagromadzeniem się kwasów organicznych w przestrzeni peribakteroidalnej i/lub mniejszą ilością NH_4^+ wydzielonego do niej przez bakteroidy [17]. Produkcja amoniaku przez bakteroidy ma zatem ogromne znaczenie dla rozwoju i utrzymania efektywnej symbiozy [5], chociaż nie chroni ona tkanki bakteroidalnej przed starzeniem się. W starzejących się brodawkach *Psophocarpus tetragonolobus* następuje ekspresja noduliny będącej inhibitorem proteaz [74]. Jednak dotychczas nie wyjaśniono jej roli w procesie starzenia się tkanki bakteroidalnej.

Na podstawie danych literaturowych nie można nakreślić uniwersalnego schematu procesu starzenia się tkanki bakteroidalnej. Początkowym etapem starzenia się tkanki bakteroidalnej komonicy, które ma miejsce w okresie dojrzwania rośliny, a także po usunięciu części nadziemnej, jest tworzenie pęcherzyków przez membrany peribakteroidalne oraz agregacja tych membran w centralnej części komórek zainfekowanych. Następnie bakteroidy skupiają się, ich nukleoidy stają się granularne, by wreszcie ulec rozkładowi w obrębie membrany peribakteroidalnej [129]. Z kolei w brodawkach soi zainfekowanych nieefektywnych szczepem *B. japonicum* (RH31-Marburg), liza bakteroidów zachodzi w specjalnych pęcherzykach tworzących się w sąsiedztwie jądra komórkowego. Wyizolowano także szczepy, które tworzą stabilne symbiosomy, wprawdzie podlegające lizie, ale ze znacznym opóźnieniem [150].

Prawdopodobnie proces starzenia się komórek gospodarza zachodzić może według odmiennych scenariuszy. Starzenie się komórek zainfekowanych efektywnych brodawek lucerny przebiega podobnie w nienaruszonych roślinach, jak i po odcięciu części nadziemnej. Polega ono na degeneracji cytoplazmy komórek gospodarza i membran peribakteroidalnych, zanim wystąpią jakiegokolwiek zmiany w strukturze bakteroidów [127]. Natomiast procesy degeneracyjne w cytoplazmie komórek zainfekowanych efektywnych brodawek łubinu zachodzą dopiero po degeneracji bakteroidów, która następuje

w obrębie membrany peribakteroidalnej nie wykazującej zmian [41]. Podobna sytuacja ma miejsce w nieefektywnych brodawkach soi utworzonych przez szczep *B. japonicum* 8-0, gdzie zupełnej dezintegracji bakteroidów w obrębie membrany peribakteroidalnej towarzyszy niemal niezmienną strukturą cytoplazmy komórek gospodarza, której jądro oraz część mitochondriów i plastydów nie wykazuje żadnych zmian strukturalnych [8]. W efektywnych brodawkach grochu najczęściej pierwsze degenerują bakteroidy, a dopiero potem cytoplazma gospodarza. Czasami jednak, w pojedynczych komórkach zainfekowanych, degeneruje cytoplazma gospodarza przy nie zmienionej strukturze bakteroidów [14].

Utrata zdolności do wiązania azotu, będąca wynikiem mechanicznego usunięcia części nadziemnej (zbiór lub wypasanie), jest odwracalna [45]. Ponowny rozwój części nadziemnej umożliwia powstanie nowej populacji brodawek na korzeniach komonicy, zastępującej brodawki zdegenerowane. Natomiast brodawki lucerny degenerują tylko w części nasadowej. Ich merystem wytwarza nową tkankę bakteroidalną, gdy otrzyma odpowiednią ilość asymilatów ze zregenerowanej części pędowej rośliny [124]. Zatem w obu przypadkach warunkiem niezbędnym dla odzyskania zdolności wiązania N_2 jest regeneracja części pędowej i odpowiednie zaopatrzenie brodawek w asymilaty. Oprócz usunięcia części nadziemnej także inne stresy wywołują przedwczesne starzenie się tkanki bakteroidalnej, jak niska temperatura [145] lub odwodnienie [29, 30].

PRZEDZIAŁOWOŚĆ BRODAWKI A WIĄZANIE AZOTU

ZNACZENIE KORY I PRZESTWORÓW MIĘDZYKOMÓRKOWYCH W BRODAWCE – DYFUZJA TLENU

Wiązanie azotu cząsteczkowego w brodawkach roślin motylkowatych wymaga stałego dopływu odpowiednich ilości tlenu do bakteroidów, niezbędnych dla podtrzymania wysokiego poziomu ich fosforylacji oksydacyjnej. Poziom metabolizmu brodawek jest wysoki (o wiele wy-

ższy niż w korzeniu) i porównywalny z poziomem metabolizmu liści. Stąd, pomimo istnienia bariery dyfuzyjnej, konsumpcja tlenu wymaga, aby jego dopływ był odpowiednio szybki. Zapasy tlenu w brodawce (tlen związany z leghemoglobiną i w przestworach gazowych oraz rozpuszczony w wodzie) wystarczają bowiem jedynie na kilka sekund jej funkcjonowania [143]. Jednocześnie stężenie tlenu w brodawce musi być odpowiednio niskie, by nie doszło do zniszczenia nitrogenazy [25, 29, 30, 51, 56, 101, 110, 111, 153]. Peryderma i endoderma brodawki oraz glikoproteinowe wypełnienia przestworów międzykomórkowych w jej korze są pierwszą barierą, jaką napotyka tlen dyfundujący do tkanki bakteroidalnej. Bariera ta zapewnia jedynie ograniczoną kontrolę tempa dyfuzji tlenu do wnętrza brodawki. Natomiast warstwa graniczna zbudowana z komórek ściśle do siebie przylegających, będąca częścią kory wewnętrznej (Ryc. 1, 2, 3), pełni prawdopodobnie funkcję bariery precyzyjnie kontrolującej dyfuzję gazów do tkanki bakteroidalnej [18, 35, 57, 155]. Dyfuzja tlenu wewnątrz brodawek zachodzi prawdopodobnie dzięki ciągłemu systemowi gazowych przestworów międzykomórkowych, łączących tkankę bakteroidalną z fazą gazową gleby [10]. Jednak inne dane wskazują, że przestwory międzykomórkowe kory środkowej brodawki nigdy nie łączą się z analogicznymi przestworami w strefie rozdzielającej. Natomiast pozbawiona ich warstwa graniczna może być ważnym elementem strukturalnym, decydującym w dużej mierze o wartości oporu dyfuzyjnego dla tlenu [58, 91]. Używając specyficznych mikroelektrod wykazano, że stężenie tlenu gwałtownie spada na granicy kory i tkanki bakteroidalnej [117]. Wynosi ono mniej niż 1.0 mMol/m^3 (ok. 10000 razy mniej niż w powietrzu) w tkance bakteroidalnej brodawek grochu i fasoli [156]. Podobnie jest w korzeniu, gdzie stwierdza się wyższe stężenie tlenu w jego korze niż w walcu osiowym, chociaż w glebie nasyconej wodą może być odwrotnie. Wynika to stąd, że dyfuzja tlenu do wnętrza korzenia zachodzi w kierunku radialnym (z gleby) i osiowym (z części pędowej) [4]. Nie są znane autorowi dane dotyczące dyfuzji tlenu z tkanek korzenia do brodawek.

Można jednak oczekiwać, że w przypadku brodawek rozwijających się blisko szyjki korzeniowej, mogą być one zaopatrywane w tlen dyfundujący zarówno przez korę brodawki jak i z pędu.

Matematyczny model dyfuzji O_2 przewiduje, że skuteczną barierą dla dyfuzji gazów w brodawce powinny być przestwory międzykomórkowe wypełnione wodą, w której dyfuzja tlenu jest około 10000 razy wolniejsza niż w fazie gazowej [56]. Badania mikroskopowe w ciemnym polu ujawniły szybką, bo zachodzącą w ciągu kilku minut, reakcję brodawek na wzrost stężenia tlenu, polegającą na stopniowym zaniku powietrznych przestworów międzykomórkowych w obrębie tkanki bakteroidalnej i na granicy tejże z korą wewnętrzną [156]. Także wiele innych danych świadczy o istnieniu w brodawce bariery dyfuzyjnej dla tlenu. Zaliczyć tu trzeba wysoką aktywność nitrogenazy brodawek grochu wówczas, gdy stężenie tlenu w atmosferze otaczającej korzeń jest wysokie [102]. Ponadto powolny wzrost stężenia tlenu z 21 do 81% niewiele zwiększa tempo oddychania brodawek konieczny białej. Z drugiej strony, nawet przy łagodnym tempie wzrostu stężenia tlenu wokół brodawek soi i sparcecy do wartości ponad 40%, ich nitrogenazy ulegają inaktywacji. W takich samych warunkach nitrogenazy brodawek konieczny białej, grochu i lucerny nie ulegają zniszczeniu. Jednak gwałtowny wzrost stężenia tlenu (do 80%) wokół brodawek grochu, niszczy ich nitrogenazę [80]. Ponadto stwierdzono, że młode brodawki grochu wykazują większą tolerancję na 80% stężenie tlenu, aniżeli brodawki starsze [102]. Zatem musi istnieć mechanizm regulujący opór dyfuzyjny dla O_2 .

Prawdopodobnie zmiany turgoru komórek mogą regulować liczbę powietrznych przestworów w brodawce [80]. Inne badania wskazują na prawdopodobny wzrost oporu dyfuzyjnego dla tlenu w brodawce w odpowiedzi na zacienianie, defoliację lub odwodnienie, co zmniejsza tempo oddychania, a zatem i wiązania N_2 [29, 30, 35, 51, 143].

Ostatnio zaproponowano wspólny mechanizm działania czynników wpływających na tempo wiązania azotu, polegający na zmianach

turgoru komórek otaczających wiązki przewodzące w brodawce wskutek: (1) naruszenia równowagi w dostarczaniu wody do brodawki poprzez floem i eksportu jej poprzez ksylem oraz (2) zmiany stężenia cukrów rozpuszczalnych i związków azotowych w apoplaście i symplaście kory brodawki. Zmiany turgoru tych komórek mogłyby regulować objętość przestworów międzykomórkowych w korze brodawki, a zatem i dyfuzję tlenu do tkanki bakteroidalnej [143].

Brodawki wspięgi przystosowują się do wzrostu i funkcjonowania przy nieatmosferycznym stężeniu tlenu, dzięki czemu wiążą duże ilości azotu. Uważa się, że adaptacja brodawek do stężenia tlenu w zakresie 5–60% polega na szybkim dopasowaniu przewodnictwa gazów (zmiany w oporze dyfuzyjnym) podczas, gdy poniżej 5% i powyżej 60% na dłużej trwających modyfikacjach strukturalnych [5, 25]. Okazuje się, że spadek stężenia tlenu wokół brodawek soi z 21% do 2.5% nie zmniejsza wyraźnie poziomu syntezy i eksportu ureidów. Prawdopodobnie, oprócz mechanizmów regulujących tempo dyfuzji tlenu w brodawce w zależności od jego zewnętrznego stężenia, ma miejsce adaptacja biochemiczna polegająca na wzroście aktywności enzymów związanych z asymilacją amoniaku [5]. W warunkach na stałe zmniejszonego lub podwyższonego stężenia O_2 , tworzą się natomiast brodawki odpowiednio mniejsze lub większe, co dopasowuje odległość tkanki bakteroidalnej od fazy gazowej w glebie [25].

Rozważa się także udział glikoproteidów obecnych w przestworach międzykomórkowych brodawek grochu i soi, mających wspólne epitopy z glikoproteidami matriksu nici infekcyjnej [15, 58, 130], jako czynnika regulującego opór dyfuzyjny dla tlenu. Stwierdzono bowiem, że wraz ze wzrostem stężenia tlenu w ryzosferze, rośnie zawartość glikoproteidów w brodawkach. Ponieważ są one obecne w przestworach międzykomórkowych, to mogłyby regulować ich drożność, od której zależy tempo dyfuzji tlenu [58]. Nie wiadomo jednak, jak szybko takie wypełnienia postają i czy są odwracalne. Zatem istotne wydają się być dwa składniki strukturalne kory brodawki, wpływające na opór dyfuzyj-

ny dla gazów, a mianowicie warstwa graniczna i glikoproteidowe wypełnienia przestworów międzykomórkowych [58].

Oprócz zmniejszonego stężenia tlenu, także obniżenie temperatury, zacienienie lub dodanie do pożywki KNO_3 prowadzą do zmniejszenia rozmiarów gazowych przestworów międzykomórkowych w korze wewnętrznej brodawki, poprzez wypełnienie ich glikoproteinami oraz w wyniku zwiększania się rozmiarów komórek [35]. Jedną z najnowszych hipotez zakłada, że zwiększone stężenie O_2 wokół brodawek powoduje depolaryzację plazmolemy ich komórek. W jej wyniku następowałby wypływ wody i jonów nieorganicznych zmniejszający objętość gazowych przestworów międzykomórkowych [36]. Dodatnią stroną tej hipotezy jest to, że tłumaczy ona szybkie i odwracalne reakcje brodawki na zmiany stężenia tlenu.

Dyfuzja tlenu do wnętrza brodawki, zachodząca poprzez przestwory międzykomórkowe, jest określana jako dyfuzja prosta. Prawidłowe funkcjonowanie bakteroidów wrażliwych na wysokie stężenie tlenu wymaga obecności leghemoglobiny w cytoplazmie podstawowej komórek zainfekowanych. Wiąże ona silnie wolny tlen, czego efektem jest wzrost gradientu stężenia tego gazu pomiędzy cytoplazmą komórek zainfekowanych a przestworami międzykomórkowymi. Następstwem braku leghemoglobiny w komórkach zainfekowanych byłoby uszkodzenie nitrogenazy w bakteroidach leżących blisko przestworów międzykomórkowych spowodowane zbyt wysokim stężeniem tlenu. Natomiast w centrum tych komórek powstawałyby warunki beztlenowe ograniczające syntezę ATP w bakteroidach. Utrzymanie wysokiego poziomu wiązania azotu w brodawce nie byłoby wówczas możliwe [111].

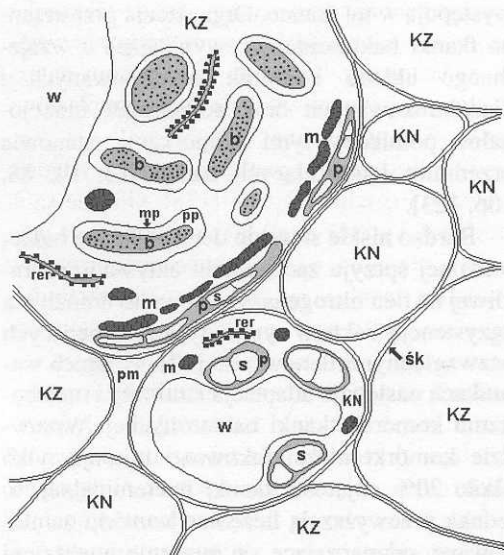
KOMÓRKI ZAINFEKOWANE I NIEZAINFEKOWANE TKANKI BAKTEROIDALNE

Komórkom zainfekowanym towarzyszą zwykle komórki niezainfekowane tworzące razem tkankę bakteroidalną (Ryc. 4). Wyjątkowo, np. u *Lupinus luteus* [40], *Arachis hypogaea*, *Crotalaria sp.* oraz kilkoma gatunkami *Aeschynomeneae* [18], komórki niezainfekowane nie

występują w tej tkance. Organizacja przestrzenna tkanki bakteroidalnej, wynikająca z wzajemnego układu komórek zainfekowanych i niezainfekowanych oraz powiązania funkcjonalne pomiędzy tymi komórkami, stanowią przedmiot interesujących badań [13, 14, 88, 106, 123].

Bardzo niskie stężenie tlenu w tkance bakteroidalnej sprzyja zachowaniu aktywności wrażliwej na tlen nitrogenazy, a ponadto umożliwia egzystencję bakterii symbiotycznych będących bezwzględnie tlenowcami [17]. W takich warunkach następuje adaptacja struktury i metabolizmu komórek tkanki bakteroidalnej. Wprawdzie komórki niezainfekowane zajmują tylko około 20% objętości tkanki bakteroidalnej, to jednak przewyższają liczebnie komórki zainfekowane, odznaczając się znacznie większymi rozmiarami. Ponadto rozmieszczenie komórek niezainfekowanych nie jest przypadkowe lecz takie, by zapewnić jak największą powierzchnię kontaktu z komórkami zainfekowanymi. Co więcej, wszystkie komórki zainfekowane są w kontakcie z co najmniej jedną komórką niezainfekowaną [107]. W tworzeniu odpowiedniej struktury przestrzennej tkanki bakteroidalnej istotną rolę odgrywa zdeterminowany proces infekowania większej komórki, powstałej po podziale nierównym komórki merystematycznej [14], który zapewnia kontakt każdej komórki zainfekowanej z przynajmniej jedną komórką niezainfekowaną. Komórki niezainfekowane tworzą szlak dla transportu różnych substancji pomiędzy tkanką bakteroidalną brodawki a jej korą. Szczególnie dużo plazmodezm występuje w ścianach przylegających do siebie komórek niezainfekowanych tkanki bakteroidalnej [17, 106].

Tylko komórki niezainfekowane brodawek zdeterminowanych mają duże peroksosomy oraz rozwinięty system tubularnego endoplazmatycznego retikulum [87]. Wykazano, że komórki te są odpowiedzialne za ostatnie etapy biosyntezy ureidów, tzn. alantoiny i kwasu alantoinowego [49, 87]. Należy podkreślić, że w brodawkach niezeterminowanych syntetyzujących amidy, nie stwierdzono podobnego zróżnicowania strukturalnego i metabolicznego po-



Ryc. 4. Schemat tkanki bakteroidalnej. b – bakteroid, KN – komórka niezainfekowana, KZ – komórka zainfekowana, m – mitochondrium, mp – membrana peribakteroidalna, p – plastyd, pm – przestrzeń międzykomórkowa, pp – przestrzeń peribakteroidalna, s – ziarno skrobi, rer – szorstkie endoplazmatyczne retikulum, šk – ściana komórkowa, w – wakuola.

Fig. 4. Schematic representation of bacteroidal tissue. b – bacteroid, KN – uninfected cell, KZ – infected cell, m – mitochondrium, mp – peribacteroidal membrane, p – plastid, pm – intercellular space, pp – peribacteroidal space, s – starch granule, rer – rough endoplasmic reticulum, šk – cell wall, w – vacuome.

między komórkami zainfekowanymi i niezainfekowanymi.

Przemiana sacharozy w kwasy organiczne odbywa się głównie w komórkach niezainfekowanych [23, 68]. Odznaczają się one ponadto wysoką aktywnością karboksylazy fosfoenolopirogronianowej i dehydrogenazy jabłczanowej [31, 37, 68], co sugeruje, że jabłczan będący doskonałym substratem podtrzymującym funkcje życiowe bakteroidów [22], jest głównym źródłem węgla dostarczanego komórkom zainfekowanych. Natomiast w komórkach zainfekowanych występuje leghemoglobina, stanowiąca około 25% cytoplazmatycznych białek gospodarza [17], a także pojawiają się broda-

wkowo-specyficzne formy szeregu enzymów jak: podjednostka syntazy sacharozowej [116], urikaza II, syntetaza glutaminowa (fasola), dehydrogenaza ksantynowa (soja, wspaniały) [139].

PRZEDZIAŁY KOMÓRKOWE A SYMBIOZA

MEMBRANA PERIBAKTEROIDALNA I PRZESTRZEŃ PERIBAKTEROIDALNA

Pojedyncza komórka zainfekowana może zawierać do 20000 bakteroidów [139], przy czym każdy zamknięty jest wówczas w przedziale utworzonym przez membranę peribakteroidalną (Ryc. 4). W ten sposób potencjalnie patogeniczne bakterie odseparowane są od cytoplazmy komórek gospodarza, dzięki czemu nie występuje reakcja obronna na infekcję [33, 121, 122]. Powstawanie membran peribakteroidalnych jest pod względem ilościowym jednym z najbardziej dominujących procesów strukturalnych i biochemicznych, który zachodzi w komórkach zainfekowanych brodawek efektywnych. Świadczy o tym łączna powierzchnia membran peribakteroidalnych przewyższająca 20–40 krotnie powierzchnię plazmolemy tych komórek [138, 148].

Membrana peribakteroidalna pochodzi od plazmolemy otaczającej nić infekcyjną [44, 78, 119, 139]. Obie te błony wykazują powinowactwo do kwasu fosforo-wolframowego [138]. Membrana peribakteroidalna i plazmolemma mają wprawdzie tę samą K^+/H^+ – ATP-azę, jednak tylko membrana peribakteroidalna posiada także Mg^{2+}/H^+ – ATP-azę, która występuje ponadto w tonoplaście i błonach aparatów Golgiego [6, 138]. W rozbudowie membrany peribakteroidalnej uczestniczą prawdopodobnie pęcherzyki uwolnione z zewnętrznej błony bakteroidalnej, a zatem byłaby to membrana o charakterze hybrydowym [102].

Skład białkowy i lipidowy membrany peribakteroidalnej wydaje się być pod wpływem zarówno gospodarza, jak i mikrosymbionta. Stosunek ilości fosfolipidów do białka w membranie peribakteroidalnej jest wyższy niż w plazmolemmie, podczas gdy skład fosfolipidów przypomina ten w ER [139]. Z kolei skład kwasów

tłuszczowych jest bardziej podobny w membranie peribakteroidalnej i ER niż membranie peribakteroidalnej i aparatach Golgiego, co wskazywałoby raczej na zaangażowanie ER w rozbudowę membrany peribakteroidalnej [148]. Duża zawartość lipidów w stosunku do zawartości białek (6:1), która cechuje membranę peribakteroidalną, świadczyć ma o jej powinowactwie do cząsteczek lipofilnych, takich jak O_2 [99].

W membranie peribakteroidalnej występuje także zależna od wapnia kinaza białkowa uczestnicząca w transdukcji sygnałów pomiędzy gospodarzem i mikrosymbiontem [7]. W membranie peribakteroidalnej soi występuje ponadto siedem nodulin, których obecność lub brak zależy od efektywności szczepu bakteryjnego [148]. Jedną z nich jest nodulina-24, której funkcja nie jest znana [137] oraz nodulina-26, prawdopodobnie zaangażowana w procesy aktywnego transportu metabolitów (takich jak kwasy dwukarboksylowe) do przestrzeni peribakteroidalnej [60]. Funkcjonowanie H^+ -ATP-azy zlokalizowanej w membranie peribakteroidalnej [62] oraz systemu transportu kwasów dwukarboksylowych [120, 158] prowadzi do zakwaszenia środowiska przestrzeni peribakteroidalnej. Membrana peribakteroidalna reguluje dopływ kwasów dwukarboksylowych do przestrzeni peribakteroidalnej [93]. Z cytoplazmy gospodarza pobierany jest jabłczan i bursztynian. Związki te stanowią odpowiednie źródło energii dla bakteroidów [158]. W przestrzeni peribakteroidalnej obecne są także białka posiadające identyczne właściwości elektroforetyczne niezależnie od gospodarza (groch, bób) oraz szczepu bakteryjnego. Stąd wysnuto wniosek, że pełnią one funkcje stanowiące podstawę działania układu symbiotycznego [63].

W przestrzeni peribakteroidalnej efektywnych brodawek soi występuje izoenzym II α -mannozydazy będący enzymem markerowym wakuoli, brak jest natomiast typowo zewnątrzkomórkowego izoenzymu III [66]. Zatem pęcherzyki zawierające materiał pochodzenia apoplastowego, których odłączanie się od plazmolemy obserwowano niejednokrotnie, nie uczestniczą w tworzeniu membrany peribakteroidalnej. Nie można więc traktować wne-

trza pęcherzyka utworzonego przez membranę peribakteroidalną, jako obszaru apoplastowego. W związku z powyższym, symbiosom należy traktować, jako nowy przedział symplastowy komórki zainfekowanej [78].

W przestrzeni peribakteroidalnej występują proteazy i α -glukozydazy [148]. Obecne są w niej także kwaśne hydrolazy pochodzące z aparatów Golgiego [16]. Zatem obecność enzymów hydrolitycznych w przestrzeni peribakteroidalnej sprawia, że przedział ten ma w niskim pH właściwości lizosomu, które w określonych warunkach objawiają się lizą bakterii. Należy podkreślić, że w układach efektywnych zakwaszeniu tego przedziału przeciwdziała aktywność bakteroidów, polegająca na pobieraniu kwasów dwukarboksylowych i wydzielaniu amoniaku [62]. Amoniak będący inhibitorem proteaz, zabezpiecza wiążące azot bakteroidy przed lizą, chociaż nieefektywne szczepy bakterii mogą także tworzyć stabilne bakteroidy [76]. Zatem objawy przedwczesnej degeneracji i lizy bakteroidów, będące następstwem zarówno defektów w genomie gospodarza jak i bakterii, mają najczęściej wspólne podłoże, polegające na zakwaszeniu środowiska przestrzeni peribakteroidalnej i uaktywnieniu się enzymów hydrolitycznych.

Przestrzeń peribakteroidalna może zajmować większą część objętości komórek zainfekowanych aniżeli ich cytoplazma. Oznacza to, że rozmiary przestrzeni peribakteroidalnej muszą być ściśle regulowane, dzięki utrzymywaniu odpowiedniego ciśnienia osmotycznego jej środowiska [135]. Rozmiary przestrzeni peribakteroidalnej w brodawkach soi mogą być ważnym czynnikiem kontrolującym przepływ tlenu i innych substancji pomiędzy cytoplazmą gospodarza i bakteroidami [9, 111]. Okazuje się, że symbiozy bardziej efektywne charakteryzują się mniejszymi jej rozmiarami [157]. Badania symulacyjne dowiodły jednak, że wzrost rozmiarów przestrzeni peribakteroidalnej nie powinien zbytnio utrudniać dyfuzji tlenu do bakteroidów. Ponadto okazało się, że obecność leghemoglobiny w przestrzeni peribakteroidalnej nie jest konieczna dla prawidłowego funkcjonowania symbiosomów [109].

ENDOPLAZMATYCZNE RETIKULUM, APARATY GOLGIEGO I PEROKSYSOMY

Endoplazmatyczne retikulum (ER) jest, pod względem objętości, jednym z największych przedziałów komórek eukariotycznych, związanym bezpośrednio z syntezą białek i ich transportem w obrębie komórki [140]. W brodawkach wspięgi liczne cysterny RER oraz bogate w pęcherzyki aparaty Golgiego występują blisko plazmolemmy otaczającej nić infekcyjną, z której w procesie endocytozy uwalniane są bakterie do cytoplazmy komórek gospodarza [84, 99]. Sugeruje to, że RER i aparaty Golgiego uczestniczą w rozbudowie plazmolemmy ciągle zużywanej w procesie endocytozy bakterii. Innym przejawem aktywności metabolicznej tych organeli w brodawkach jest rozbudowa membran peribakteroidalnych [53]. Natomiast wysoka aktywność N-acetylo-galaktozaminotransferazy w aparatach Golgiego komórek zainfekowanych brodawek soi, pozwala sądzić, że przez to organelum wiedzie główny szlak dostarczający budulca do rozbudowy membran peribakteroidalnych [148].

ER jest miejscem, gdzie jest syntetyzowana fosfatydylocholina (w ER występuje fosfotransferaza cholinowa), która przemieszcza się następnie poprzez aparaty Golgiego do rozbudowującej się membrany peribakteroidalnej [77]. Nie można jednak wykluczyć, że fosfatydylocholina wchodzi w skład membrany peribakteroidalnej bez pośrednictwa aparatów Golgiego [78].

Nie obserwuje się wprowadzie ciągłości membran RER z membraną peribakteroidalną, ale zbadanie serii ultracienkich skrawków mogłoby taką ciągłość ujawnić [84]. W efektywnych brodawkach grochu stwierdzono obecność stałych miejsc kontaktu pomiędzy membranami RER i membranami peribakteroidalnymi oraz związaną z tym akumulację osmofilnego materiału (prawdopodobnie białka) w przestrzeni peribakteroidalnej [14]. Dużo cystern RER obserwuje się także w brodawkach nieefektywnych [13, 14, 73], lecz fakt ten usiłowano powiązać z ostrym niedoborem azotu w komórce [73], a nie udziałem tej struktury w rozbudowie membrany peribakteroidalnej. Wzrost liczby cystern

RER i aparatów Golgiego w strefie infekcji brodawek efektywnych oraz w strefie późnej symbiozy brodawek nieefektywnych, może być związany z syntezą enzymów hydrolitycznych lub białek niezbędnych dla rozwoju bakteroidów [65]. Ponadto w RER komórek zainfekowanych syntetyzowana jest apoproteina leghemoglobiny [136]. RER i aparaty Golgiego są też miejscem syntezy nodulin [53].

W komórkach niezainfekowanych 2–4 tygodniowych brodawek soi obserwuje się silny rozwój tubularnego ER, będącego rozszerzeniem cysternowego RER, równocześnie ze znacznym wzrostem rozmiarów peroksysomów [88]. Peroksysomy te pozostają często w ścisłym kontakcie lub łączą się z siecią tubularnego ER [134]. Obserwowano ściśle przyleganie tubul ER do tych peroksysomów, co może być związane z powstawaniem nowych peroksysomów lub powiększaniem się już istniejących [88]. Endocytoza bakterii z nici infekcyjnej do komórek zainfekowanych oraz wzrost aktywności urikazy w młodych peroksysomach komórek niezainfekowanych soi są zjawiskami zachodzącymi równocześnie [131]. Wzrost aktywności urikazy, która przekształca kwas moczowy w alantoinę [49], jest związany z pojawieniem się aktywności nitroгенаzowej w brodawkach soi [11]. W peroksysomach komórek niezainfekowanych brodawek soi występuje także alantoinaza [147], która przekształca alantoinę w kwas alantoinowy [49].

MITOCHONDRIA

Stężenie rozpuszczonego, wolnego tlenu jest bardzo niskie (poniżej 10 nM) w cytoplazmie podstawowej komórek zainfekowanych dojrzalej tkanki bakteroidalnej [3]. Mimo to, mitochondria izolowane z tkanki bakteroidalnej wspięgi [97, 98] i soi [113] wykazują wysoką aktywność oksydacyjną i fosforylacyjną, nawet wyższą niż mitochondria izolowane z korzeni [113]. Jednak w cytoplazmie podstawowej komórek zainfekowanych brodawek soi stwierdza się wysoką aktywność dekarboksylazy pirogronianowej, dehydrogenazy alkoholowej i dehydrogenazy mleczanowej [75, 113], a także obecność aldehydu octowego i etanolu [115]. Fakty

te świadczą o beztlenowym metabolizmie komórek zainfekowanych.

Mitochondria komórek zainfekowanych posiadają liczne grzebienie, na skutek intensywnego pofałdowania wewnętrznej membrany mitochondrialnej [149]. W porównaniu z mitochondriami brodawek efektywnych, te w brodawkach nieefektywnych mają grzebienie bardziej rozszerzone i elektrono-gęste [53]. W brodawkach nieefektywnych wzrasta też znacznie liczba mitochondriów, co może wskazywać na wzrost aktywności oddechowej komórek gospodarza [73]. Jednak $K_m(O_2)$ dla terminalnej oksydazy mitochondrialnej ma znacznie wyższą wartość niż stężenie tlenu w tkance bakteroidalnej. Dlatego niektórzy badacze uważają, że oddychanie mitochondrialne nie może dostarczyć wystarczającej ilości ATP dla podtrzymania szybkiego tempa redukcji N_2 . Ich zdaniem, zmniejszenie tempa oddychania mitochondrialnego komórek zainfekowanych jest przyczyną wysokiego kosztu energetycznego symbiotycznego wiązaniem azotu [97, 98]. W warunkach niskiego stężenia tlenu w mitochondriach komórek zainfekowanych funkcjonuje tylko część cyklu kwasów trójkarboksylowych, która utlenia jabłczan dostarczając szczawiooctanu i ATP. Związki te wykorzystywane są następnie w procesie asymilacji NH_3 , który zachodzi w cytoplazmie podstawowej [19]. W czasie dojrzewania komórek zainfekowanych, powierzchnia mitochondriów tych komórek zwiększa się wprawdzie czterokrotnie [88], to jednak wskutek szybkiego namnażania się i wzrostu rozmiarów bakteroidów zmniejsza się wartość stosunku powierzchni (oraz objętości) mitochondriów do bakteroidów [42].

CYTOPLAZMA PODSTAWOWA

Stwierdzono, że większa efektywność brodawek związana jest z większą objętością cytoplazmy podstawowej przypadającej na jedną komórkę zainfekowaną [157]. W cytoplazmie podstawowej tych komórek stwierdzono obecność karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, której aktywność była jednak większa w brodawkach efektywnych. Enzym ten uczestniczy w ciemniowym wiązaniu CO_2 , a jego aktywność jest

wysoko skorelowana z poziomem wiązania N_2 w łubinie [21] i lucernie [126]. Aż 90% węgla ^{14}C (podanego brodawkom w formie $^{14}CO_2$) cytosolu komórek zainfekowanych włącza się do kwasów organicznych (głównie jabłczanu), niezbędnych bakteroidom do podtrzymania wiązania N_2 wówczas, gdy oddychanie mitochondrialne komórek zainfekowanych jest ograniczone niskim stężeniem O_2 [103].

Bakteroidy wydzielają amoniak do cytoplazmy podstawowej komórek zainfekowanych, który jest w niej asymilowany przez syntetazę glutaminową i syntetazę glutaminianową [105]. Cytoplazma podstawowa komórek zainfekowanych zawiera ponadto leghemoglobinę [37, 100, 141] i syntetazę sacharozową, a także kinazę cholinową II, której silna ekspresja ma miejsce tylko w brodawkach tworzących stabilne membrany peribakteroidalne [77]. Dzięki zastosowaniu metod immunocytochemicznych stwierdzono, że leghemoglobina (lub jej apoproteina) występuje także w cytoplazmie podstawowej komórek niezainfekowanych [132], chociaż funkcja jaką ona tam spełnia pozostaje wciąż nieznana.

ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY ROZWOJEM ROŚLINY, RÓŻNICOWANIEM SIĘ BAKTEROIDÓW A WIĄZANIEM AZOTU

Intensywność wiązania azotu w dwutygodniowych brodawkach grochu jest niewielka, natomiast w trzytygodniowych osiąga najwyższą wartość. Po tym okresie intensywność wiązania azotu gwałtownie spada, aż do ledwo zauważalnego poziomu w brodawkach pięcioletniowych. W okresie wegetacji roślin jest ona ściśle związana z objętością, intensywnie zabarwionej na różowo, dojrzałej tkanki bakteroidalnej [114].

Rzadko podejmowane były próby powiązania struktury brodawek z różnicowaniem się bakteroidów, uwzględniające jednocześnie tempo wiązania azotu. Wykazały one, że aktywność nitroгенаzowa jest zawsze związana z dystalną częścią strefy dojrzałej symbiozy (Ryc.1), w której występują bakteroidy odznaczające się wyraźną heterogennością cytoplazmy [133]. Natomiast w brodawkach nieefektywnych zaobserwowano bakteroidy mało zaawansowane w

rozwoju i silnie rozwiniętą strefę przejściową brodawki charakteryzującą się obecnością dużej ilości skrobi – brak było strefy dojrzałej symbiozy (Ryc. 1) [133].

W bakteroidach brodawek koniczyny, lucerny i grochu występują struktury obłonione w postaci pęcherzyków i cystern [26, 27, 28, 38, 53]. Niewiele jest wiadomo na temat ewentualnego związku pomiędzy tymi strukturami i redukcją azotu. Zaobserwowano więcej pęcherzykowatych wpukleń wewnętrznej membrany w bakteroidach nieefektywnych szczepów *R. meliloti*, aniżeli w bakteroidach szczepu dzikiego [26, 28]. Jednak struktury obłonione w postaci zamkniętych pierścieni są charakterystyczne dla bakteroidów efektywnych brodawek grochu, a zatem mogą być związane z ich zdolnością do redukcji azotu [14].

ŹRÓDŁO ENERGII I KOSZT SYMBIOTYCZNEGO WIAZANIA AZOTU

Wiązanie azotu w brodawce korzeniowej zależy od dopływu asymilatów z bieżącej fotosyntezy [50]. Sacharoza jest głównym węglowodanem transportowanym z liści do brodawek [96]. W brodawkach występuje syntaza sacharozowa, która rozkłada sacharozę na cukry proste [69, 82]. W ten sposób brodawki otrzymują energię i szkielety węglowe niezbędne do redukcji N_2 i asymilacji wydzielonego przez bakteroidy amoniaku [48, 52]. Nakłady energetyczne ponoszone przez roślinę na przyswajanie N_2 są znaczne, gdyż potrzeba aż 15 moli ATP, aby uzyskać 1 mol zredukowanego azotu [92].

Okolo 10% produkcji fotosyntetycznej netto jest wykorzystywane w oddychaniu niezbędnym dla funkcjonowania nitrogenazy brodawek efektywnych [24]. Jednak koszt ten może być większy, gdy zmniejszy się potencjał wody w brodawce [30]. Realny koszt przyswajania azotu cząsteczkowego wynosi dla koniczyny czerwonej 4 mg węgla na 1 mg związanego azotu [146]. Tak duże nakłady energetyczne wynikają nie tylko z redukcji N_2 i asymilacji powstającego NH_3 , ale także z konieczności utworzenia brodawki i jej „utrzymania”. Sama tylko odnowa leghemoglobiny brodawek grochu, która odbywa się w ciągu zaledwie dwóch dni [12], czyli w

czasie o wiele krótszym niż okres funkcjonowania efektywnej tkanki bakteroidalnej [64], wymaga poniesienia znacznych nakładów. Należy jednak podkreślić, że koszty asymilacji i transportu 1 mola N uzyskanego w wyniku redukcji N_2 lub NO_3^- są w pełni porównywalne [95].

Brodawki soi gromadzą skrobię już we wczesnych etapach swego rozwoju. Skrobia jest odkładana najpierw w komórkach niezainfekowanych, jeszcze zanim nastąpi endocytoza bakterii do sąsiednich komórek. Zapasy skrobi w efektywnych brodawkach soi są największe na kilka dni przed szczytem w wiązaniu azotu, który przypada około szesnastego dnia po infekcji. W przeciwieństwie do efektywnych brodawek soi, nieefektywne gromadzą skrobię, lecz jej nie metabolizują [40]. Gromadzenie skrobi jest zatem procesem niezależnym od wiązania azotu, co stanowi podstawę do stwierdzenia, że brodawki akumulują skrobię tak jak bulwy korzeniowe [40].

Zawartość skrobi w brodawkach roślin rosnących w cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności zmienia się w cyklu dwunastogodzinnym, który jednak nie zawsze pokrywa się dokładnie z cyklem dnia i nocy [48]. W takich warunkach hodowli zawartość skrobi w brodawkach lucerny była największa po czterech godzinach światła, a po ośmiu godzinach ciemności stanowiła jeszcze 29% tej maksymalnej ilości [52]. Natomiast w brodawkach grochu stwierdzono najwyższą zawartość skrobi pod koniec okresu dnia i jej niemal całkowite zużycie po dwunastu godzinach ciemności [79]. Prawdopodobne jest zatem, że rytmiczne zmiany, jakim podlegają rezerwy skrobi w brodawkach, są pod kontrolą rośliny-gospodarza. Rezerwy skrobi są prawdopodobnie istotnym czynnikiem utrzymania stałego poziomu cukrów w brodawce [144]. Zmniejszają się one w wyniku defoliacji, chociaż nie ulegają pełnemu wyczerpaniu [127]. Zmniejszanie się tempa wiązania azotu, które obserwuje się nocą lub po defoliacji, nie może być zatem wyjaśnione ograniczonym dostępem do węglowodanów będących źródłem energii, lecz wzrostem oporu dyfuzyjnego dla tlenu, w następstwie czego zmniejsza się intensywność oddychania brodawek [46, 51, 144].

Jednak dobre warunki świetlne i długi dzień pozwalają na dobre zaopatrzenie brodawek w asymilaty również nocą. Nie obserwuje się wówczas zmniejszenia się aktywności nitrogenazy [152].

WPLYW CZYNNIKÓW WEWNĘTRZNYCH I ZEWNĘTRZNYCH NA FUNKCJONOWANIE BRODAWEK

Intensywność wiązania azotu w brodawkach efektywnych zależy od wielu czynników wewnętrznych (właściwości genetyczne roślin i bakterii, faza rozwojowa roślin) i zewnętrznych (natężenie światła, stężenie CO₂, warunki glabowe).

Efektywność brodawek zależy od „dopasowania” obu symbiontów. Okazuje się bowiem, że szczepy *Rhizobium fredii* (wyizolowane w Chinach) i *Bradyrhizobium japonicum* (wyizolowane w USA) indukują wprawdzie powstawanie brodawek na korzeniach północnoamerykańskich odmian uprawnych soi, jednak są one odpowiednio mniej lub bardziej efektywne [108]. Wykazano, że większa efektywność brodawek komonicy i soi może wynikać jedynie z intensywniejszego namnożenia się określonego szczepu bakterii w brodawkach. Aktywność bakteroidów w wiązaniu azotu (wyrażona ilością związanego azotu na jednostkę masy bakteroidów) może być wówczas podobna, niezależnie od szczepu bakterii, który użyto do inokulowania roślin [72, 157].

Efektywność symbiozy może zależeć też od gatunku bakterii preferującego określoną temperaturę. Brodawki komonicy powstałe po inokulacji szczepem NZP2037 *Rhizobium meliloti*, wiązały azot z maksymalną intensywnością w temperaturze 12°C, a powstałe po inokulacji szczepem CC814s, w 30°C [90]. Dowiedziano także, że bakteroidy szczepu CC814s lepiej namnażały się w brodawce [157]. Podstawą większej efektywności symbiozy komonicy z *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) może być zatem, oprócz odpowiedniej temperatury, także większa proliferacja bakterii w brodawkach. Ilość bakteroidów wpływa też na intensywność wiązania azotu w brodawkach wspięgi [142] oraz superbrodawkującego mutantu soi (nts382), który

tworzy wprawdzie większą masę brodawek niż odmiana wyjściowa, ale ilość bakteroidów przypadająca na brodawkę jest o wiele mniejsza [32].

Wykazano, że brodawki soi zmniejszają intensywność wiązania azotu w temperaturze 15°C, jednak wydajność tego procesu określona nakładem energii na jednostkę masy zredukowanego azotu, jest w tej temperaturze większa aniżeli w 20°C [145]. Natomiast inne badania pokazują, że efektywność zużycia węgla w procesie wiązania azotu nie zależy znacząco od temperatury [47].

Wydajność wiązania azotu u ciecierzycy polskiej (*Cicer arietinum* L.), wyrażona w miligramach zużytego węgla na miligram związanego azotu, zależy od fazy rozwojowej rośliny. Jest ona największa w okresie kwitnienia i w początkowym okresie tworzenia się owoców [54]. Nie oznacza to jednak, że ilość związanego azotu jest wówczas największa. Zaobserwowano bowiem zmniejszenie się tempa wiązania azotu, zwłaszcza w warunkach niesprzyjających fotosyntezie oraz wówczas, gdy rozwijające się owoce współzawodniczyły z brodawkami o asymilaty [43].

Zasolenie gleby jest także przyczyną spadku tempa wiązania azotu lub nawet degeneracji brodawek. Jednak odpowiednie zaopatrzenie brodawek w asymilaty pozwala im zredukować niekorzystne efekty zasolenia. Objawia się to ich szybką odnową po takim stresie [59].

Krótkotrwały wzrost stężenia CO₂ zwiększa wprawdzie natężenie fotosyntezy, ale nie wpływa na intensywność redukcji acetyleny. Natomiast długookresowe wzbogacenie atmosfery w CO₂ powoduje zwiększenie się intensywności redukcji acetyleny, które jednak wynika ze wzrostu ogólnej masy brodawek, a nie z większej ich aktywności redukcyjnej [39, 152]. Zatem przy określonym natężeniu fotosyntezy intensywność wiązania azotu prawdopodobnie nie jest ograniczona dostępnością asymilatów.

PODSUMOWANIE

Rozwój brodawki i jej funkcjonowanie są podporządkowane stworzeniu bakteriom odpo-

wiedniej niszy, w której różnicują się one w bakteroidy zdolne do wiązania azotu. Silne powiązanie metaboliczne symbiosomów z komórką gospodarza sprawia, że można je traktować jako część symplastu. Czas efektywnego funkcjonowania symbiosomu jest jednak bardzo ograniczony. Liza bakteroidów poprzedza lizę komórek tkanki bakteroidalnej, które funkcjonują znacznie krócej niż czas życia rośliny. Można oczekiwać, że przedłużenie okresu funkcjonowania tkanki bakteroidalnej zmniejszyłoby koszty symbiotycznego wiązania azotu zwiększając jednocześnie produktywność roślin motylkowatych.

Wykazano, że możliwa jest regulacja tempa dyfuzji gazów do brodawki, poprzez adaptację jej struktury anatomicznej i cytologicznej do warunków zewnętrznych (zmiany długookresowe) oraz poprzez zmiany drożności gazowych przestworów międzykomórkowych (zmiany krótkookresowe i długookresowe?). Wyniki wielu doświadczeń fizjologicznych wskazują na istnienie w brodawce tzw. bariery dyfuzyjnej dla tlenu. Jej lokalizacja i funkcjonowanie są tylko częściowo poznane.

Stworzono modele matematyczne dyfuzji tlenu w brodawce. Wykazały one, że leghemoglobina jest niezbędnym czynnikiem ułatwiającym dyfuzję tlenu do centralnej części komórek zainfekowanych. Jej obecność w cytoplazmie podstawowej komórek zainfekowanych utrzymuje stężenie tlenu na stałym i odpowiednio niskim poziomie, zabezpieczając wrażliwą na tlen nitrogenazę przed uszkodzeniem. Zapewne istotną modyfikacją tych modeli byłoby założenie, że możliwe są ruchy cytoplazmy komórek zainfekowanych, często obserwowane w wielu innych typach komórek roślinnych. Oczywiście ruch cytoplazmy przyspieszałby dyfuzję tlenu w obrębie komórki, co mogłoby mieć duże znaczenie w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na tlen, związanego ze wzrostem tempa redukcji azotu.

Można mówić o swoistej dla brodawek korzeniowych kompartmentacji polegającej na tym, że stężenie tlenu w tkance bakteroidalnej jest o wiele niższe aniżeli w korze brodawki. Warunki tlenowe panujące w tkance bakteroi-

dalnej są dodatkowo zróżnicowane, gdyż leghemoglobina obecna jest tylko (lub w przeważającej części!) w komórkach zainfekowanych. Ponadto w komórkach zainfekowanej działają dwa różne typy oddychania, tj. mikroaerobowe w bakteroidach i beztlenowe w cytoplazmie komórek zainfekowanych.

Brodawka korzeniowa roślin motylkowatych jest doskonałym modelem dla interdyscyplinarnych badań procesów skoordynowanego różnicowania się komórek roślinnych i bakteryjnych na poziomie: strukturalnym, funkcjonalnym i genetyczno-molekularnym. Wyniki tych badań nie tylko wzbogacają wiedzę o rozwoju i funkcjonowaniu brodawki, ale mają także ogromne znaczenie ogólnobiologiczne.

LITERATURA

- [1] APPLEBY C. A. 1969. Electron-transport systems of *Rhizobium japonicum*. I. Hemoprotein P-450, other CO-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroids from N₂-fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* **172**: 71–87.
- [2] APPLEBY C. A. 1969. Electron-transport systems of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. *Biochim. Biophys. Acta* **172**: 88–105.
- [3] APPLEBY C. A. 1984. Leghemoglobin and rhizobium respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443–478.
- [4] ARMSTRONG W., STRANGE M. E., CRINGLE S., BECKETT P. M. 1994. Microelectrode and modelling study of oxygen distribution in roots. *Ann. Bot.* **74**: 287–299.
- [5] ATKINS C. A., DAKORA F. D., STORER J. P. 1990. Effect of pO₂ on the synthesis and export of nitrogenous solutes by nodules of cowpea. *Planta* **182**: 565–571.
- [6] BASSARAB S., MELLOR R. B., WERNER D. 1986. Evidence for two types of Mg⁺⁺ ATPase in the peribacteroid membrane from *Glycine max* root nodules. *Endocyt. Cell Res.* **3**: 189–196.
- [7] BASSARAB S., WERNER D. 1987. Ca²⁺-dependent protein kinase activity in the peribacteroid membrane from soybean root nodules. *J. Plant. Physiol.* **130**: 233–241.
- [8] BASSET B., GOODMAN R. N., NOVACKY A. 1977. Ultrastructure of soybean nodules. II. Deterioration of the symbiosis in ineffective nodules. *Can. J. Microbiol.* **23**: 873–883.
- [9] BERGERSEN F. J. 1982. Root nodules of legumes: structure and functions. Research Studies Press, Chichester, UK, ss. 164.
- [10] BERGERSEN F. J., GOODCHILD D. J. 1973. Aeration pathways in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**: 729–740.
- [11] BERGMANN H., PREDDIE E., VERMA D. P. S. 1983. Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) in-

- duced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**: 2333–2339.
- [12] BISSELING T., VAN STRATEN J., HOUWAARD F. 1980. Turnover of nitrogenase and leghemoglobin in root nodules of *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* **610**: 360–370.
- [13] BORUCKI W. 1994. Stukturalne podstawy efektywności brodawek korzeniowych grochu powstałych w wyniku infekcji różnymi szczepami *Rhizobium leguminosarum*. Praca doktorska. SGGW. Warszawa. npubl.
- [14] BORUCKI W. 1996. Some new aspects of the pea (*Pisum sativum* L.) root nodule ultrastructure. *Acta Soc. Bot. Pol.* **65**: 221–233.
- [15] BRADLEY D. J., WOOD E. A., LARKINS A. P., GALFRE G., BUTCHER G. W., BREWIN N. J. 1988. Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **173**: 149–160.
- [16] BREWIN N. J. 1990. The role of the plant plasma membrane in symbiosis. W: C. LARSSON, I. M. MÖLLER (red.), *The Plant Plasma Membrane*. Springer-Verlag, Berlin s. 351–375.
- [17] BREWIN N. J. 1991. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 191–226.
- [18] BROWN, S. M., WALSH, K. B. 1994. Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**: 49–68.
- [19] BRYCE J. H., DAY D. A. 1990. Tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria from soybean nodules and cotyledons. *J. Exp. Bot.* **41**: 961–967.
- [20] BUCHEMEIER N. A., HEFFRON F. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**: 730–732.
- [21] CHRISTELLER J. T., LAING W. A., SUTTON W. D. 1977. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenol-pyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol.* **60**: 47–50.
- [22] COPELAND L., QUINNELL R., DAY D. A. 1989. Malic enzyme activity in soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2005–2011.
- [23] COPELAND L., VELLA J., HOHG Z. 1989. Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean plants. *Phytochemistry* **28**: 57–61.
- [24] CULVENOR R. A., DAVIDSON I. A., SIMPSON R. J. 1989. Regrowth by swards of subterranean clover after defoliation. 2. Carbon exchange in shoot, root and nodule. *Ann. Bot.* **64**: 557–567.
- [25] DAKORA F. D., ATKINS C. A. 1990. Morphological and structural adaptation of nodulus of cowpea to functioning under sub – and supra-ambient oxygen pressure. *Planta* **182**: 572–582.
- [26] DART P. J., MERCER F. V. 1963. Development of the bacteroids in the root nodule of barrel medic (*Medicago tribuloides* Desr.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Arch. Mikrobiol.* **47**: 382–401.
- [27] DART P. J., MERCER F. V. 1963. The intracytoplasmatic membrane system of the bacteroids of subterranean clover nodules (*Trifolium subterraneum* L.). *Arch. Mikrobiol.* **47**: 1–18.
- [28] DART P. J., MERCER F. V. 1964. Fine structure changes in the development of the nodules of *Trifolium subterraneum* L. and *Medicago tribuloides* Desr. *Arch. Mikrobiol.* **47**: 1–18.
- [29] DAVEY A. G., SIMPSON R. J. 1990. Nitrogen fixation by subterranean clover at varying stages of nodule dehydration. I. Carbohydrate status and short-term recovery of nodulated root respiration. *J. Exp. Bot.* **41**: 1175–1187.
- [30] DAVEY A. G., SIMPSON R. J. 1990. Nitrogen fixation by subterranean clover at varying stages of nodule dehydration. II. Efficiency of nitrogenase functioning. *J. Exp. Bot.* **41**: 1189–1197.
- [31] DAY D. A., MANNIX M. 1988. Malate oxidation by soybean nodule mitochondria and the possible consequences for nitrogen fixation. *Plant Physiol. Biochem.* **26**: 567–573.
- [32] DAY D. A., PRICE G. D., SCHULLER K., GRESSHOFF P. M. 1987. Nodule physiology of supernodulating soybean (*Glycine max*) mutant. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 527–538.
- [33] DAY D. A., PRICE G. D., UDVARDI M. K. 1989. Membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum* – *Glycine max* symbiosis: peribacteroid units from soybean nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* **16**: 69–84.
- [34] DE FARIA S. M., 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.
- [35] DE LORENZO C., JANNETTA P. P. M., FERNANDEZ-PASCUAL M., JAMES E. K., LUCAS M. M., SPRENT J. I., WITTY J. F., MINCHIN F. R., DE FELIPE M. R. 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules. II. Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**: 1469–1474.
- [36] DENISON R. F., KINRAIDE T. B. 1995. Oxygen-induced membrane depolarizations in legume root nodules. *Plant Physiol.* **108**: 235–240.
- [37] DEROCHE M-E., CARRAYOL E. 1988. Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74**: 775–782.
- [38] DIXON R. O. D. 1964. The structure of infection threads, bacteria and bacteroids in pea and clover root nodules. *Arch. Mikrobiol.* **48**: 166–178.
- [39] FINN G. A., BRUN W. A. 1982. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on growth, nonstructural carbohydrate content, and root nodule activity in soybean. *Plant Physiol.* **69**: 327–331.
- [40] FORREST S. I., VERMA D. P. S., DHINDSA R. S. 1991. Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Can. J. Bot.* **69**: 697–701.
- [41] GOLINOWSKI W., KOPCIŃSKA J., BORUCKI W. 1987. The morphogenesis of lupine root nodules during infection by *Rhizobium lupini*. *Acta Soc. Bot. Pol.* **56**: 687–703.
- [42] GOLINOWSKI W., KOPCIŃSKA J., BORUCKI W. 1992. Morphometric characteristics of the bacteroidal tissue in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) nodules. *Acta Soc. Bot. Pol.* **61**: 307–318.

- [43] GOMES M. A. F., GODEK L. 1987. Reproductive development and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.). *J. Exp. Bot.* **38**: 1982–1987.
- [44] GOODCHILD D. J., BERGERSEN F. J. 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.* **92**: 204–213.
- [45] GORDON A. J., KESSLER W. 1990. Defoliation-induced stress in nodules of white clover. II. Immunological and enzymatic measurements of key proteins. *J. Exp. Bot.* **41**: 1255–1262.
- [46] GORDON A. J., KESSLER W., MINCHIN F. R. 1990. Defoliation-induced stress in nodules of white clover. I. Changes in physiological parameters and protein synthesis. *J. Exp. Bot.* **41**: 1245–1253.
- [47] GORDON A. J., MACDUFF J. H., RYLE G. J. A., POWELL C. E. 1989. White clover N₂ – fixation in response to root temperature and nitrate. II. N₂-fixation, respiration, and nitrate reductase activity. *J. Exp. Bot.* **40**: 527–534.
- [48] GORDON A. J., RYLE G. J., MITCHEL D. F., LOWRY K. M., POWELL C. E. 1986. The effect of defoliation on carbohydrate, protein and leghaemoglobin content of white clover nodules. *Ann. Bot.* **58**: 141–154.
- [49] HANKS J. F., SCHUBERT K., TOLBERT N. E. 1983. Isolation and characterization of infected and uninfected cells from soybean nodules. *Plant Physiol.* **71**: 869–873.
- [50] HARDY R. W. F., HAVELKA U. D. 1975. Photosynthate as the major factor limiting N₂ fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. W: P. S. Nutman (red.), *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge University Press, London, s. 421–439.
- [51] HARTWIG U., BOLLER B., NOSBERGER J. 1987. Oxygen supply limits nitrogenase of clover nodules after defoliation. *Ann. Bot.* **59**: 285–291.
- [52] HENSON C. A., DUKE S. H., KOUKKARI W. L. 1986. Rhythmic oscillations in starch concentration and activities of amylolytic enzymes and invertase in *Medicago sativa* nodules. *Plant Cell Physiol.* **27**: 233–242.
- [53] HIRSCH A. M., BANG M., AUSUBEL F. M. 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by nif⁺Tn 5 mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **155**: 367–380.
- [54] HOODA R. S., SHEORAN I. S., SINGH R. 1989. Distribution of ¹⁴CO₂ during ontogeny of chickpea (*Cicer arietinum*) grown at two moisture levels. *Ann. Appl. Biol.* **114**: 367–376.
- [55] HOSTAK M. S., HENSON C. A., DUKE S. H., VAN DEN BOSCH K. A. 1987. Starch granule distribution between cells types of alfalfa nodules as affected by symbiotic development. *Can. J. Bot.* **65**: 1108–1115.
- [56] HUNT S., GAITO S. T., LAZRELL D. B. 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II Characterization of the diffusion barrier and estimation of the concentration of CO₂, H₂ and N₂ in the infected cells. *Planta* **173**: 128–141.
- [57] IANNETTA P. P. M., DE LORENZO C., JAMES E. K., FERNANDEZ-PASCUAL M., SPRENT J. I., LUCAS M. M., WITTY J. W. F., DE FELIPE M. R., MINCHIN F. R. 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**: 1461–1467.
- [58] JAMES E. K., SPRENT J. I., MINCHIN F. R., BREWIN N. J. 1991. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. *Plant Cell Environ.* **14**: 467–476.
- [59] JAMES E. K., SPRENT J. I., HAY G. T., MINCHIN F. R. 1993. The effect of irradiance on the recovery of soybean nodules from sodium chloride induced senescence. *J. Exp. Bot.* **44**: 997–1005.
- [60] JOHNSON K. D., HOFTE H., CHRISPEELS M. J. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *Plant Cell* **2**: 525–532.
- [61] JONES A. M., DANGL J. L. 1996. Longjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* **1**: 114–119.
- [62] KANNENBERG E. L., BREWIN N. J. 1989. Expression of a cell surface antigen from *Rhizobium leguminosarum* 3841 is regulated by oxygen and pH. *J. Bacteriol.* **171**: 4543–4548.
- [63] KATINAKIS P., VAN KAMMEN A., VAN DEN BOSCH R. C. 1988. Protein composition of the peribacteroid space in root nodules of *Pisum sativum* and *Vicia faba* induced by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**: 115–118.
- [64] KIENE J. W. 1975. The fine structure of pea root nodules. II. Senescence and desintegration of the bacteroid tissue. *Physiol. Plant Pathol.* **7**: 17–21.
- [65] KIENE J. W., PLANQUE K. 1979. Ultrastructural study of the endomembrane system in infected cells of pea and soybean root nodules. *Physiol. Plant Pathol.* **14**: 339–345.
- [66] KINNBACH A., MELLOR R. B., WERNER D. 1987. Alpha-mannosidase II isoenzyme in the peribacteroid space of *Glycine max* root nodules. *J. Exp. Bot.* **38**: 1373–1377.
- [67] KNEEN B. E., LARUE T. A., HIRSCH A. M., SMITH C. A., WEEDEN N. F. 1990. Sym 13-a gene conditioning ineffective nodulation in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **94**: 899–905.
- [68] KOUCHI M., FUKAI K., KATAGIRI H., MINAMISAVE K., TAJIME S. 1988. Isolation and enzymological characterization of infected and uninfected cell protoplasts from nodules of *Glycine max*. *Physiol. Plant.* **73**: 327–334.
- [69] KSTER H., FRHLING M., PERLICK A. M., PHLER A. 1993. The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 507–514.
- [70] LEROUGE P., ROCHE P., FAUCHER C., MAILLET F., TRUCHET G., PROM J.-C., DNARI J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature (London)* **344**: 781–788.
- [71] LIBBENGA K. R., HARKES P. A. A. 1973. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. *Planta* **114**: 17–28.
- [72] LIN J., WALSH K. B., CONVIN D. T., LAYZELL D. B. 1988. Structural and physiological bases for effective-

- ty of soybean nodules formed by fast-growing bacteria. *Can. J. Bot.* **66**: 526–534.
- [73] MACKENZIE C. R., JORDAN D. C. 1974. Ultrastructure of root nodules formed by ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **20**: 755–758.
- [74] MANEN J-F, SIMON P., VAN SLOOTEN J-C, OSTERAS M., FRUTIGER S., HUGHES G. J. 1991. A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *Plant Cell* **3**: 259–270.
- [75] MAZUROWA H., RATAJCZAK L. 1989. Anaerobic processes in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) root nodules. *Acta Biochim. Pol.* **36**: 257–262.
- [76] MELLOR R. B. 1989. Bacteroids in *Rhizobium-Legume* symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. *J. Exp. Bot.* **40**: 831–839.
- [77] MELLOR R. B., CHRISTENSEN T. M. I. E., WERNER D. 1986. Choline kinase II is present only in nodules that synthesize stable peribacteroid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 659–663.
- [78] MELLOR R. B., WERNER D. 1987. Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis* **3**: 75–100.
- [79] MINCHIN F. R., PATE J. S. 1974. Diurnal functioning of the legume root nodule. *J. Exp. Bot.* **25**: 295–308.
- [80] MINCHIN F. R., SHEEHY J. E., MINGUER M. J., WITTY J. F. 1985. Characterization of the resistance to oxygen diffusion in legume nodules. *Ann. Bot.* **55**: 53–60.
- [81] MITCHELL J. P. 1965. The DNA content of nuclei in pea root nodules. *Ann. Bot.* **29**: 371–377.
- [82] MORRELL M., COPELAND L. 1984. Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. Alkaline invertase. *Plant Physiol.* **74**: 1030–1034.
- [83] NEWCOMB W. 1976. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *J. Cell Biol.* **141**: 93–118.
- [84] NEWCOMB W., MCINTYRE L. 1981. Development of root nodules of mung bean (*Vigna radiata*): a reinvestigation of endocytosis. *Can. J. Bot.* **59**: 2478–2499.
- [85] NEWCOMB W., SIPPPELL D., PETERSON R. L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**: 2603–2616.
- [86] NEWCOMB W., SYONO K., TORREY J. G. 1977. Development of an ineffective pea root nodule: morphogenesis, fine structure and cytokinin biosynthesis. *Can. J. Bot.* **55**: 1891–1907.
- [87] NEWCOMB E. H., TANDOM S. R. 1981. Uninfected cell of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* **212**: 1394–1396.
- [88] NEWCOMB E. H., TANDOM S. R., KOWAL R. R. 1985. Ultrastructural specialization for ureide production in uninfected cells of soybean root nodules. *Protoplasma* **125**: 1–12.
- [89] OLSZEWSKA M. J., LEGOCKI A. B. 1989. Changes in DNA content during rhizobial nodule development in *Lupinus luteus* L.. I. Cytophotometry and autoradiography. *Biol. Zentralbl.* **108**: 221–230.
- [90] PANKHURST C. E., LAYZELL D. B. 1984. The effect of bacterial strain and temperature changes on the nitrogenase activity of *Lotus pedunculatus* root nodules. *Physiol. Plant.* **62**: 404–409.
- [91] PARSONS R., DAY D. A. 1990. Mechanisms of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant Cell Environ.* **13**: 501–512.
- [92] POSTGATE J. 1977. Consequences of the transfer of nitrogen fixing genes to new hosts. *Ambio* **6**: 178–180.
- [93] PRICE G. D., DAY D. A., GRESSHOFF P. M. 1987. Rapid isolation of intact peribacteroid envelopes from soybean nodules and demonstration of selective permeability to metabolites. *J. Plant. Physiol.* **130**: 157–164.
- [94] QUISPÉL A. 1988. Bacteria-plant interactions in symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Plant.* **74**: 783–790.
- [95] RAVEN J. A. 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytol.* **101**: 25–77.
- [96] REIBACH P. H., STREETER J. G. 1983. Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* **72**: 634–640.
- [97] RHAWSTHORNE S., LARUE T. A. 1986. Preparation and properties of mitochondria from cowpea nodules. *Plant Physiol.* **71**: 869–873.
- [98] RHAWSTHORNE S., LARUE T. A. 1986. Metabolism under microaerobic conditions of mitochondria from cowpea nodules. *Plant Physiol.* **81**: 1097–1102.
- [99] ROBERTSON J. G., LYTLETON P., BULLIVANT S., GRAYSTON G. J. 1978. Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell Sci.* **30**: 129–149.
- [100] ROBERTSON J. G., WELLS B., BISSELING T., FAMDEN K. J. F., JOHNSTON A. W. B. 1984. Immuno-gold localization of leghaemoglobin in cytoplasm in nitrogen-fixing root nodules of pea. *Nature* **90**: 452–457.
- [101] ROBSON R. L., POSTGATE J. R. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 183–207.
- [102] ROSENDAHL L., JAKOBSEN I. 1988. Effects of age, supra-ambient oxygen and repeated assays on acetylene reduction and root respiration in pea. *Plant Physiol.* **74**: 77–82.
- [103] ROSENDAHL L., VANCE C. P., PEDERSEN W. B. 1990. Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* **93**: 12–19.
- [104] ROTH L. E., STACEY G. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* **49**: 13–23.
- [105] SCHUBERT K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539–574.
- [106] SELKER J. M. L. 1988. Three-dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma* **147**: 178–190.
- [107] SELKER J. M. L., NEWCOMB E. H. 1985. Spatial relationships between uninfected and infected cells in root nodules of soybean. *Planta* **165**: 446–454.

- [108] SHANTHARAM S., DUTEAU N. M., PRAKASH R. K., ATHERLY A. G. 1987. Comparative cytology of effective and ineffective root nodules of North American cultivars of *Glycine max* L. formed by two *Rhizobium fredii* strains. *Cytobios* **50**: 181–190.
- [109] SHEEHY J. E., BERGERSEN F. J. 1986. A simulation study of the functional requirements and distribution of leghaemoglobin in relation to biological nitrogen fixation in legume root nodules. *Ann. Bot.* **58**: 121–136.
- [110] SHEEHY J. E., MINCHIN F. R., WITTY J. F. 1983. Biological control of the resistance to oxygen flux in nodules. *Ann. Bot.* **52**: 565–571.
- [111] SHEEHY J. E., MINCHIN F. R., WITTY J. F. 1985. Control on nitrogen fixation in a legume nodule: an analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. *Ann. Bot.* **55**: 549–562.
- [112] SPAINK H. P. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol. Biol.* **20**: 977–986.
- [113] SUGANUMA N., YAMAMOTO Y. 1987. Respiratory metabolism of mitochondria in soybean root nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* **33**: 93–101.
- [114] SYONO K., NEWCOMB W., TORREY J. G. 1976. Cytokinin production in relation to the development of pea root nodules. *Can. J. Bot.* **54**: 2155–2162.
- [115] TAJIMA S., LARUE T. A. 1982. Enzymes for acetaldehyde and ethanol formation in legume nodules. *Plant Physiol.* **70**: 388–392.
- [116] THUMMLER F., VERMA D. P. S. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730–14736.
- [117] TIEPKEMA J. D., YOCUM C. S. 1974. Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrode. *Planta* **119**: 351–360.
- [118] TRUCHET G., MICHEL M., DENARIE J. 1980. Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation* **16**: 163–172.
- [119] TU J. C. 1975. Structural similarity of the membrane envelopes of rhizobial bacteroids and the host plasma membrane as revealed by freeze fracturing. *J. Bacteriol.* **122**: 691.
- [120] UDVARDI M. K., PRICE G. D., GRESSHOFF P. M., DAY D. A. 1988. A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **231**: 36–40.
- [121] VANCE C. P. 1983. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 399–424.
- [122] VANCE C. P., BOYLAN K. L. M., STADE S. 1987. Host plant determinants of legume nodule function: similarities to plant disease situations. W: S. NISHIMURE i in. (red.), *Molecular Determinants of Plant diseases*, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, s. 271–287
- [123] VANCE C. P., EGLI M. A., GRIFFITH S. M., MILLER S. S. 1988. Plant regulated aspects of nodulation and N₂ fixation. *Plant Cell Environ.* **11**: 413–427.
- [124] VANCE C. P., HEICHEL G. H., BARNES D. K., BRYAN J., JOHNSON L. E. 1979. Nitrogen fixation, nodule development and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiol.* **64**: 1–8.
- [125] VANCE C. P., HEICHEL G. H., PHILLIPS D. A. 1988. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. Alfalfa and Alfalfa Improvement – Agronomy Monograph no 29, Madison, WI 53711, USA.
- [126] VANCE C. P., JOHNSON L. E. B. 1983. Plant determined ineffective nodules in alfalfa (*Medicago sativa*): structural and biochemical comparisons. *Can. J. Bot.* **61**: 93–106.
- [127] VANCE C. P., JOHNSON L. E. B., HALVORSEN A. M., HEICHEL G. H., BARNES D. K. 1980. Histological and ultrastructural observations of *Medicago sativa* root nodule senescence after foliage removal. *Can. J. Bot.* **58**: 295–309.
- [128] VANCE C. P., JOHNSON L. E. B., HARDARSON G. 1980. Histological comparisons of plant and *Rhizobium* induced ineffective nodules in alfalfa. *Physiol. Plant Pathol.* **17**: 167–173.
- [129] VANCE C. P., JOHNSON L. E. B., STADE S., GROOT R. G. 1982. Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) root nodules: morphogenesis and the effect of forage harvest on structure and function. *Can. J. Bot.* **60**: 505–518.
- [130] VAN DEN BOSCH K. A., BRADLEY D. J., KNOX J. P., PERATTO S., BUTCHER G. W., 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.
- [131] VAN DEN BOSCH K. A., NEWCOMB E. H. 1986. Immunological localization of nodule-specific uricase in developing soybean nodules. *Planta* **167**: 425–436.
- [132] VAN DEN BOSCH K. A., NEWCOMB E. H. 1988. The occurrence of leghemoglobin protein in the uninfected interstitial cells of soybean root nodules. *Planta* **175**: 442–451.
- [133] VASSE J., DE BILLY F., CAMUT S., TRUCHET G. 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**: 4295–4306.
- [134] VAUGHN K. C. 1985. Structural and cytochemical characterization of three specialized peroxisome types in soybean. *Physiol. Plant.* **64**: 1–12.
- [135] VERMA D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**: 373–382.
- [136] VERMA D. P., BALL S., GUERIN C., WANAMAKER L. 1979. Leghemoglobin biosynthesis in soybean root nodules. Characterization of the nascent and released peptides and the relative rate of synthesis of the major leghemoglobins. *Biochemistry* **18**: 476–483.
- [137] VERMA D. P. S., FORTIN M. G., STANLEY J., MAURO V. P., PUROHIT S., MORRISON N. 1986. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max*. A perspective. *Plant Mol. Biol.* **7**: 51–61.
- [138] VERMA D. P. S., KAZAZIAN V., ZOGBI V., BAL A. K. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in root nodules. *J. Cell Biol.* **78**: 919–936.

- [139] VERMA D. P. S., STANLEY J. 1985. Molecular interactions in endosymbiosis between legume plants and nitrogen-fixing microbes. *Ann. New York Acad. Sci.* **503**: 284–294.
- [140] VITALE A., CERIOTTI A., DENECKE J. 1993. The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J. Exp. Bot.* **44**: 1417–1444.
- [141] VIVO A., ANDREU J. M., DE LA VINA S., DE FELIPE M. R. 1989. Leghemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* cv Multolupa). *Plant Physiol.* **90**: 452–457.
- [142] WADISIRISUK P., WEAVER R. W. 1985. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. *Plant Soil* **87**: 223–231.
- [143] WALSH K. B. 1995. Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 637–655.
- [144] WALSH K. B. 1990. Vascular transport and soybean nodule function. III: implications of a continual phloem supply of carbon and water. *Plant Cell Environ.* **13**: 893–901.
- [145] WALSH K. B., LAYZELL D. B. 1986. Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. *Plant Physiol.* **80**: 249–255.
- [146] WAREMBOURG F. R., ROUMET C. 1989. Why and how to estimate the cost of symbiotic N_2 fixation? A progressive approach on the use of ^{14}C and ^{15}N isotopes. *Plant Soil* **115**: 167–177.
- [147] WEBB M. A., NEWCOMB E. H. 1987. Cellular compartmentation of ureide biogenesis in root nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Planta* **172**: 162–175.
- [148] WERNER D., BASSARAB S., HUMBECK C., KAPE R., KINNBACH A., MELLER R. B., MRSCHER E., PARNISKE M., PAUSCH G., ROHM M., SCHENK S., THIERFELDER H., THYNN M., WEITZEL A., WOLF A. 1988. Nodule proteins and compartments. W: BOTHE, DE BRUIJN, NEWTON (red.), *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*, Gustav Fischer, Stuttgart, New York, s. 507–515.
- [149] WERNER D., MRSCHER E. 1978. Differentiation of nodules of *Glycine max*. Ultrastructural studies of plant cell and bacteroids. *Planta* **141**: 169–177.
- [150] WERNER D., MRSCHER E., KORT R., MELLER R. B., BASSARAB S. 1984. Lysis of bacteroids in the vicinity of the host cell nucleus in an ineffective (Fix-) root nodule of soybean (*Glycine max*). *Planta* **162**: 8–16.
- [151] WERNER D., MRSCHER E., STRIPP R., WINCHENBACH B. 1980. Development of nodules of *Glycine max* infected with an ineffective strain of *Rhizobium japonicum*. *Planta* **147**: 320–329.
- [152] WILLIAMS L. E., DEJONG T. M., PHILLIPS D. A. 1982. Effect of changes in shoot carbon-exchange rate on soybean root nodule activity. *Plant Physiol.* **69**: 432–436.
- [153] WINTER H. C., BURRIS R. M. 1976. Nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 409–426.
- [154] WITTENBERG J. B., BERGERSEN F. F., APPLEBY C. A., TURNER G. L. 1974. Facilitated diffusion of O_2 : the role of oxylethamoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* **249**: 4057–4066.
- [155] WITTY J. F., MINCHIN F. R., SKOT L., SHEEHY J. E. 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol.* **3**: 275–314.
- [156] WITTY J. F., SKOT L., RUSBECH N. P. 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodule to O_2 diffusion. *J. Exp. Bot.* **38**: 1129–1140.
- [157] WOOD S. M., LAYZELL D. B., NEWCOMB W., PANKHURST C. E. 1985. A morphometric study of effective nodules induced by *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) on *Lotus pedunculatus*. *Can. J. Bot.* **63**: 43–53.
- [158] YANG L. J. O., UDVARDI M. K., DAY D. A. 1990. Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta* **182**: 437–444.