

# HORMONALNA KONTROLA PROCESU NODULACJI

## THE HORMONAL CONTROL OF NODULATION

Emilia WILMOWICZ, Agata KUĆKO, Barbara ZABROCKA-NOWAKOWSKA,  
Krzysztof PRZEDNICZEK, Aleksandra FLORKIEWICZ, Katarzyna PANEK

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
w Toruniu

Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Układ symbiotyczny pomiędzy roślinami motylkowatymi (*Fabaceae* L.), a Gram-ujemnymi bakteriami *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium* określanymi ogólną nazwą rizobium, prowadzi do powstawania brodawek korzeniowych. Są to wysoce zorganizowane struktury, będące niszą o zoptymalizowanych dla mikroorganizmów warunkach. Wewnątrz nich, w odpowiedzi na produkowane przez bakterie czynniki nodulacji – Nod (ang. *Nodulation Factors*, NF), dochodzi do wiązania azotu atmosferycznego. Morfogeneza brodawek korzeniowych jest kontrolowana lokalnie, sprzężeniem zwrotnym pomiędzy bakteryjnym symbiontem i gospodarzem oraz systemowo, dzięki funkcjonowaniu systemu autoregulacji nodulacji (ang. *Autoregulation Of Nodulation*, AON). Oba mechanizmy znajdują się pod kontrolą fitohormonów, a czynniki Nod utrzymują ich odpowiedni balans, co warunkuje skuteczne wykształcenie brodawek korzeniowych. Na uwagę zasługuje fakt, że rizobia wykazują zdolność syntezy fitohormonów, przez co modulują efektywność symbiozy. Dotychczasowe publikacje polskojęzyczne przedstawiają biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin, natomiast niniejsza praca podejmuje to zagadnienie w kontekście hormonów. Artykuł ukazuje aktualne informacje dotyczące udziału kwasu absycynowego, auksyn, brassinosteroidów, cytokinin, giberelin, etylenu i jasmonianów w kontroli procesu nodulacji.

*Słowa kluczowe:* nodulacja, fitohormony, brodawki korzeniowe, rizobia, czynniki Nod

*Summary:* The symbiosis between legumes (*Fabaceae* L.) and Gram-negative bacteria *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium* called rhizobium, leads to the formation of nodules. These are highly organized structures that are niches with optimal for microorganisms conditions. Within them, in response to nodulation factors Nod (NF) produced by bacteria, atmospheric nitrogen fixation takes place. The morphogenesis of nodules is controlled locally – by feedback between bacterial symbiont and host plant, and systemically – through the autoregulation of the nodulation system

(AON). Both mechanisms are controlled by phytohormones, and Nod factors maintain their proper balance, which determines the successful development of nodules. Even more noteworthy is the fact, that rhizobia have the ability to synthesize phytohormones, thus modulate the effectiveness of symbiosis. So far, Polish publications describe the biochemical and molecular basis of plant-microbe symbiotic interactions, whereas this manuscript presents this subject in the context of hormones. Our paper summarized the current state of knowledge on the contribution of abscisic acid, auxin, brassinosteroids, cytokinins, gibberellins, ethylene and jasmonates in the control of nodulation.

*Keywords:* nodulation, phytohormones, root nodules, Rhizobia, Nod factors

## WPROWADZENIE

W odpowiedzi na czynniki stresowe, np. głód azotowy lub związki osmotycznie czynne, korzenie roślin motylkowatych (*Fabaceae* L.) wydzielają do ryzosfery betainy i flawonoidy – chemoatraktanty specyficzne dla określonych gatunków, a nawet szczepów mikrosymbiontów [14]. Substancje te są obficie wydzielane nie tylko bezpośrednio w miejscu inokulacji, ale także przez wierzchołek korzenia i w pełni rozwinięte włosniki korzeniowe. Podczas inicjacji infekcji rhizobia wydzielają rikadhezynę, która wiąże jony  $Ca^{2+}$  i zewnątrzkomórkowe polisacharydy na powierzchni włosnika, co pozwala na ich przyleganie. Czynnikiem sprzyjającym adhezji bakterii do włosnika są także produkowane przez roślinę glikoproteiny – lektyny. W kolejnym etapie bakterie syntetyzują celulozowe fibryle tworzące biofilm na wierzchołku włosnika [50].

Flawonoidy oddziałują z białkiem NodD (ang. *Nodulin D*), które łącząc się do konserwatywnych sekwencji *nod box* występujących w regionach promotorycznych genów brodawkowania (ang. *nodulation genes*, *nod*) stymuluje ich aktywność transkrypcyjną. Należący do tej grupy gen *NodD* jest jedynym, który ulega konstytutywnej ekspresji zarówno u bakterii wolnożyjących, jak i będących w symbiozie z gospodarzem [38]. W komórkach ryzodermy, w odpowiedzi na lipochitoooligosacharydowe czynniki Nod, dochodzi do alkalizacji cytozolu i depolaryzacji błony komórkowej wywołanej krótkotrwałym napływem jonów  $Ca^{2+}$ . Oscylacje wapniowe, a także wypływ jonów  $Cl^-$  i  $K^+$  z komórki, prowadzące do zmiany organizacji cytoszkieletu aktynowego, inicjują deformację włosników [50]. Może to zachodzić wskutek zahamowania wzrostu ściany komórkowej i skręcenia włosnika w miejscu przylegania bakterii. Funkcjonuje również mechanizm, w którym po przeciwnej stronie zainfekowanego miejsca, ekspansywny rozwój ściany komórkowej wywołuje skręcenie korzeni włosnikowych i uformowanie tzw. „laski pasterza” [50].

Czynniki Nod łączą się ze zlokalizowanymi w epidermie korzenia receptormi typu kinaz LysM (ang. *receptor-like kinase*), gdzie uruchamiają szlak przekazywania sygnału prowadzący do wytworzenia brodawki [58]. Brodawki nie-

zdeteminowane, charakteryzujące się trwałą aktywnością merystemu, powstają na skutek podziałów wewnętrznej kory korzenia, natomiast zdeteminowane, o zahamowanej aktywności komórek merystematycznych, zostają wykształcone w korze zewnętrznej. *Rizobia* tworzą w brodawkach wiążące azot bakteroidy [50]. Produkty genów *Nod* stymulują w roślinie aktywność transkrypcyjną wczesnych (ang. *Early Nodulin*, *ENOD*) i późnych (*NOD*) genów nodulinowych. Ekspresja genów *rip1* (ang. *rhizobium-induced peroxidase*), *ENOD12* i *ENOD5* następuje już po kilku godzinach od infekcji. Późne geny nodulinowe są aktywne bezpośrednio przed lub podczas wiązania azotu, a należą do nich m.in. geny kodujące grupę prostetyczną leghemoglobiny. Jest to enzym, który odpowiada za utrzymanie optymalnego poziomu tlenu bez wytworzenia nadmiernego ciśnienia parcjalnego tego pierwiastka, co mogłoby uszkodzić nitrogenazę i w konsekwencji zahamować wiązanie azotu [21].

### **KWAS ABCYSYNOWY**

Dane dotyczące udziału kwasu abscysynowego (ang. *Abscisic Acid*, ABA) w procesie nodulacji nie są jednoznaczne. Wyniki analiz fizjologicznych z zastosowaniem syntetycznego fitohormonu potwierdzają, że hamuje on tworzenie brodawek korzeniowych, m.in. u *Medicago truncatula*, *Trifolium repens*, *Phaseolus vulgaris* i *Lotus japonicus* [4, 9, 53, 56]. Podanie inhibitora biosyntezy ABA – abaminy, zwiększa ilość wytwarzanych brodawek oraz stopień wiązania azotu u *L. japonicus* i *T. repens* [53, 56]. Wyższe stężenie endogennego ABA w brodawkach korzeniowych różnych gatunków roślin motylkowatych, w porównaniu do sąsiadujących tkanek, wskazuje jednak na jego nieodzowność dla prawidłowego rozwoju tych struktur [11]. Te rozbieżne informacje sugerują, że rola ABA nie ogranicza się do określonego etapu procesu nodulacji. Nie można również wykluczyć, że jego działanie związane jest z indukcją odpowiedzi stresowych.

Kwas abscysynowy hamuje deformację włośników warunkującą tworzenie zawiązków brodawek u *T. repens* [52], natomiast u *M. truncatula* wstrzymuje infekcję i obniża ekspresję genów nodulacji (*ENOD11*, *RIP1*) oraz czynników *Nod*, które indukują fluktuacje poziomu wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  we włośnikach [9]. Jest to mechanizm wpływający zarówno na infekcję, jak i sam rozwój brodawek, uruchamiany najprawdopodobniej w warunkach stresowych, w celu zmniejszenia kosztów wysokoenergetycznego procesu ich tworzenia. Odmienne rezultaty uzyskano w badaniach prowadzonych na *Medicago sativa*, gdzie ABA aplikowany na korzenie przed zadziałaniem stresu solnego zwiększał efektywność wiązania azotu. Jak wykazano, spowodowane to było aktywacją enzymów antyoksydacyjnych [37]. Co więcej, ABA jako sygnał stresu suszy, redukując ilość i aktywność leghemoglobiny, m.in. u *Pisum sativum* i *P. vulgaris* zaburza

dyfuzję tlenu w brodawkach korzeniowych, czego konsekwencją jest zahamowanie działania nitrogenazy katalizującej wiązanie azotu [36].

Odwroćenie inhibicyjnego działania ABA na tworzenie brodawek korzeniowych obserwowano u niewrażliwego na ten hormon mutantu *L. japonicus* – *Beyma*. Charakteryzował się on obniżonym turgorem, jednak wytwarzał taką samą ilość brodawek w odpowiedzi na egzogenny ABA, jak rośliny o normalnym fenotypie [4]. Należy zaznaczyć, że brodawki te były mniejsze. Podobną zależność zaobserwowano u niewrażliwego na ten fitohormon mutantu *L. japonicus* (ang. *enhanced nitrogen fixation 1, enf1*) charakteryzującego się podwyższonym stopniem nodulacji oraz efektywnością wiązania azotu [56]. Powyższe dane potwierdzają wcześniej postawioną hipotezę zakładającą nieodzowność ABA do prawidłowej morfogenezy brodawek.

Przejawem mutacji genu *LATD* u *M. truncatula* jest uszkodzenie merystemów korzeni oraz brodawek. Rośliny te wprawdzie wykazują podobną do typu dzikiego zawartość ABA, jednak są na niego mniej wrażliwe. Na skutek zahamowania aktywności komórek merystematycznych tworzone są u nich mniejsze brodawki, ale proces samej inicjacji zawiązków tych struktur nie jest zaburzony. Świadczy to o zaangażowaniu ABA w regulację późniejszych etapów ich rozwoju [26]. Podanie tego fitohormonu mutantom *Glycine max* (*nod1-3*) o podwyższonym stopniu nodulacji obniża poziom izoflawonoidów, co negatywnie wpływa na ilość tworzonych brodawek. Dodatkowo wykazano, że ABA działając antagoniście do cytokinin (CK), hamuje podziały komórek kory, przez co ogranicza morfogenezę brodawek.

Rizobia mogą także syntetyzować ABA, wpływając nie tylko na sam przebieg nodulacji, ale także przyczyniać się do wzrostu tolerancji roślin na stres. Ciekawą zależność obserwowano u *Rhizobium leguminosarum*, u którego odpowiednio niski poziom biosyntezy ABA i wysoki giberelin oraz auksyn podnosi biomasa gospodarza uprawianego w warunkach suszy [2]. Fakt, że ABA nie stanowi elementu AON (ang. *Autoregulation Of Nodulation*), a działa jedynie lokalnie [4] oraz rozbieżność uzyskiwanych wyników badań fizjologicznych, nie pozwalają na precyzyjne określenie mechanizmu działania tego fitohormonu.

## AUKSYNY

Prawidłowy transport auksyn warunkujący ich optymalny poziom w tkankach jest kluczowy dla wszystkich etapów nodulacji. W rozwijającym się organie musi być zachowany odpowiedni gradient stężenia tych fitohormonów, który pozwala na utrzymanie równowagi pomiędzy szybkością podziałów komórkowych, a różnicowaniem. Wpływ auksyn na rozwój brodawek zależy od stężenia zastosowa-

nego roztworu, miejsca jego aplikacji, fazy rozwoju korzenia, a także interakcji z innymi fitohormonami. Wysoki poziom kwasu indolilo-3-octowego (ang. *Indole-3-Acetic Acid*, IAA) występuje w zawiązkach brodawek korzeniowych *M. truncatula*, *G. max* i *L. japonicus*, jednak z drugiej strony, auksyny aplikowane na korzenie hamują powstawanie brodawek. Wykazano, że w strukturach o niezdecydowanym typie wzrostu, np. u *M. truncatula*, inicjacja nodulacji związana jest z zatrzymaniem przepływu auksyn, za co odpowiadają czynniki Nod oraz produkowane w komórkach kory flawonoidy [33, 61]. Dodatkowo, wyniki uzyskane u *Arabidopsis thaliana* wskazują, że flawonoidy mogą wpływać na aktywność peroksydaz, które katalizują utlenianie auksyn, jednak dotychczas nie wykazano doświadczalnie funkcjonowania takiej zależności podczas nodulacji. W przypadku brodawek zdecydowanych, m.in. u *G. max* proces ten nie zależy od przemieszczania się auksyn. Warto nadmienić, że w parenchymie obu typów brodawek zaobserwowano ekspresję genu odpowiedzi na IAA, którego produkt determinuje miejsce rozwoju naczyń przewodzących [51].

Akumulacja auksyn podczas inicjacji brodawek korzeniowych związana jest przede wszystkim ze zmniejszeniem ich eksportu przy udziale białka z rodziny PIN i PGP. Za import tych fitohormonów odpowiadają z kolei białka z rodziny peremeazy aminokwasowej AUX1 (ang. *Auxin resistant 1*), LAX (ang. *LikeAUX1*) i PGP4 oraz MDR/PGP (ang. *Multidrug Resistance/P-Glycoprotein*) [39]. Lokalizację i ekspresję genów *PIN* można modulować doświadczalnie stosując inhibitory transportu auksyn. Zarówno syntetyczny kwas N-naftylopalmitynowy (NPA), jak i kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy (TIBA) powodują tworzenie pseudobrodawek korzeniowych u *M. truncatula*, nawet bez infekcji rizobiów [20]. Sugeruje to, że inhibicja transportu auksyn jest wystarczająca do uruchomienia programu nodulacji.

Podstawą funkcjonowania AON jest bazypetalny transport auksyny. Mutant *M. truncatula* (*sun1*) charakteryzujący się zwiększoną zdolnością przemieszczania tego fitohormonu z pędu do korzeni, nie traci tej zdolności po inokulacji rizobiami, tak jak ma to miejsce w przypadku roślin typu dzikiego. Podanie inhibitorów transportu auksyn redukuje ilość brodawek wytwarzanych przez *sun1* [47]. Nie zbadano jednak podobnej zależności u innych gatunków roślin.

Auksyny mogą być syntezowane przez rizobia. Mutacja w genach szlaku biosyntezy tych fitohormonów u *Rhizobium* sp. NR234 powoduje obniżenie ich zawartości w brodawkach korzeniowych i prowadzi do zahamowania wiązania azotu. Natomiast intensywne produkcje auksyny może zwiększać efektywność nodulacji [49]. Mechanizm tego zjawiska nie został dotąd poznany. Niezwykle ciekawym i nieopisanym zagadnieniem, jest wpływ auksyny produkowanej przez mikrosymbionty na budowę korzenia i nodulację. Nie można wykluczyć, że wytwarzane w ten sposób fitohormony stymulują wzrost wydłużeniowy tego organu, co zwiększa prawdopodobieństwo powstania brodawek.

## **BRASINOSTEROIDY**

Brasinosteroidy (BR), stanowiące grupę ponad 70 związków polihydroksylo- wanych pochodnych steroli, regulują symbiozę brodawkową. Obecnie wiadomo, że egzogenne BR stymulują proces nodulacji oraz wiązania azotu u *P. sativum* i *G. max*. Podobnie jak w przypadku innych fitohormonów, ich działanie zależy od rodzaju BR oraz czasu i miejsca aplikacji [12, 48, 55]. Inkubacja nasion *Lens culina- ris* w roztworze 28-homobrassinolidu skraca długość korzenia i zmniejsza liczbę tworzonych brodawek, ale z drugiej strony podnosi aktywność reduktazy azota- nowej [18]. Odmiennie rezultaty obserwowano u *P. sativum*, u którego traktowa- nie nasion 24-epibrassinolidem zwiększa stopień nodulacji, świeżą i suchą masę brodawek oraz aktywność nitrogenazy [48]. Podobne efekty przyniosło nawożenie dolistne epibrassinolidem u *Arachis hypogaea* i *P. vulgaris*, przy czym u drugie- go z gatunków to samo działanie wywołuje homobrassinolid [59, 60]. Podanie BR na korzeń mutantu *Glycine (en6500)*, wytwarzającego nadmierną ilość brodawek, hamuje nie tylko ich morfogenezę, ale także wzrost samego organu, a efekt ten od- wraca inhibitor ich biosyntezy [36]. Podobne zmiany na poziomie fizjologicznym zaobserwowano, gdy BR aplikowano na liście, skąd prawdopodobnie są transporto- wane do korzenia. Były to pierwsze dane wskazujące, że przemieszczanie się tych fitohormonów w pędzie może pośrednio wpływać na efektywność nodulacji.

Początkowo uważano, że BR wykazują działanie systemiczne i są cząsteczkami sygnałowymi w AON, jednak taką funkcję wykluczają wyniki badań prowadzonych na mutantach *P. sativum (nod3, sym28, sym29)* z uszkodzonym systemem autoregu- lacji. Charakteryzują się one nadmiernym wytwarzaniem brodawek, a BR nie wpły- wają u tych roślin na ekspresję genów uczestniczących w AON [13]. Sporna kwestia udziału omawianych fitohormonów w regulacji systemowej wymaga dalszych analiz, zwłaszcza na poziomie molekularnym. Ich rezultatem jest m.in. stwierdzenie, że wa- runkiem koniecznym do zajścia procesu nodulacji jest percepcja BR, ponieważ mu- tacje w genach będących elementami szlaku transdukcji ich sygnału (*LK, LKB, LKA*) redukują ilość korzeni bocznych oraz wielkość brodawek u *P. sativum* [12]. Obecny stan wiedzy nie wyjaśnia, które z obserwowanych efektów są wynikiem bezpośred- niego działania BR, a w których procesach mogą one jedynie pośredniczyć wchodząc w interakcje z innymi fitohormonami. Przykładem jest zwiększanie ekspresji genów *PIN* u *A. thaliana*, co umożliwia polarny transport IAA warunkujący nodulację [45].

## **CYTOKININY**

Cytokininy będące izopentenylowymi pochodnymi adeniny uczestniczą w ini- cjacji nodulacji, podziałach komórek kory w korzeniu, samej organogenezie bro- dawek, a także regulacji aktywności głównych enzymów wiążących azot atmosfere-

ryczny. Percepcja CK w komórkach kory korzenia warunkuje inicjację nodulacji. W przekazywanie sygnału tych fitohormonów zaangażowany jest gen *MtLOG1* (ang. *LONELY GUY*), którego białkowy produkt kontroluje inicjację i różnicowanie oraz liczbę powstających brodawek [34]. Podczas inicjacji dochodzi do aktywacji genów odpowiedzi na CK. W niezdeterminowanym typie brodawek ma to miejsce w wewnętrznych komórkach kory, podczas gdy w tych o ograniczonym typie wzrostu, w jej zewnętrznych warstwach [19, 28, 42]. Nie wiadomo jednak czy zjawisko to wynika ze zwiększenia wrażliwości komórek na CK, czy również podniesienia tempa ich biosyntezy. Co ciekawe, Mortier i współpracownicy [34] wykazali, że u *M. truncatula* w pierwszej fazie percepcji CK jednocześnie wzrasta ich biosynteza. Autorzy postulują, że do rozwoju brodawek korzeniowych wymagana jest synteza tych fitohormonów *de novo*.

Odpowiedź rośliny na hormon zależy od stanu kompetencji, tj. wrażliwości komórki lub tkanki wynikającej z obecności specyficznych receptorów. Wyciszenie genu *MtCRE1* (ang. *Cytokinin Response1*) kodującego receptor CK u *M. truncatula*, prowadzi do wytworzenia większej ilości korzeni bocznych i mniejszej liczby brodawek w porównaniu do typu dzikiego. U *L. japonicus* gen *LHK1* (ang. *Lotus Histidine Kinase 1*) koduje receptor CK będący błonową, histydyno/asparaginianową kinazą białkową, indukującą w komórkach kory korzenia ekspresję genów *Nod* (ang. *Nodulation Signaling Pathway2, NSP2*) i *NIN* (ang. *Nodule Inception*), których produkty łączą się z promotorami genów wczesnej nodulacji [58, 46]. Defekt w genie *LHK1* u mutantu *hit1* powoduje utratę aktywności kinazowej, co prowadzi do zatrzymania podziałów komórek kory, czego konsekwencją jest brak brodawek. Potwierdzają to wyniki badań Held'a i współpracowników [19], według których *LHK1* po wnikięciu bakterii może pośredniczyć w przekazywaniu sygnału z epidermy do kory. Nadekspresja *LHK1* u mutantu *snf2* skutkuje spontanicznym tworzeniem się brodawek bez infekcji bakteryjnej. Nie można więc wykluczyć, że proces inicjacji jest kontrolowany przez inne receptory. Mutanty *L. japonicus* (*hit1-1, lhk1*) i *M. truncatula* (ang. *cytokinin response1, cre1*) wykazujące zaburzenia w percepcji CK nie są zdolne do tworzenia primordiów brodawek korzeniowych [15, 35, 40]. Dodatkowo warto zaznaczyć, że mutacja *cre1* powoduje zmiany w poszczególnych strefach starszych brodawek, co wskazuje, że CK są ważne również nie tylko w początkowych, ale i późniejszych etapach ich rozwoju.

Istotne jest, że jeśli CK syntetyzowane są we floemie pędu – hamują nodulację, jednak wpływają pozytywnie na ten proces gdy produkowane są niezależnie od AON w korzeniu. Sasaki i współpracownicy [46] potwierdzili, że ekspresja genu *LjIPT3* (ang. *Isopentenyl Transferase3*) kodującego transferazę izopentenyłową u *L. japonicus*, która jest odpowiedzialna za syntezę CK podczas nodulacji, koreluje z podwyższoną ich syntezą zarówno w pędzie, jak i korzeniu. Gen *LjIPT3* aktywny transkrypcyjnie w korzeniu indukuje powstawanie brodawek,

natomiast w pędzie wpływa negatywnie na nodulację [7, 43, 45]. Ponadto, jego ekspresję w pędzie, inaczej niż w korzeniu, warunkuje percepcja CK przy udziale kinazy HAR1.

Infekcja bakteryjna u *L. japonicus* zapoczątkowuje akumulację peptydów CLE-RS1/2 w korzeniach. Białka te transportowane są do pędu, gdzie łączą się z receptorem HAR1, czego efektem jest produkcja CK. Utworzenie kompleksu CLE-RS1/2-HAR1 dodatkowo powoduje nagromadzenie cząsteczek SDI (ang. *Shoot-Derived Inhibitor*). Te z kolei przemieszczają się do korzenia, w którym hamują brodawkowanie [46]. Pula aktywnych CK jest u *L. japonicus* regulowana aktywnością oksydaz/dehydrogenaz cytokininowych (ang. *Cytokinin oxidase/dehydrogenase*, CKX3), które odpowiadają za obniżanie ich poziomu w korzeniu. We wczesnej fazie inicjacji nodulacji dochodzi do indukowanej czynnikiem Nod ekspresji genu *Ckx3*, która utrzymuje się na wysokim poziomie także w późniejszych stadiach rozwoju tych struktur [43].

Cytokiny regulują proces brodawkowania współdziałając z innymi fitohormonami, w tym etylenem (ET) i IAA. Wykazano, że stabilizują syntazę ACC katalizującą przekształcenie *S*-adenozynometioniny (SAM) w kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy (ACC) – bezpośredni prekursor ET. Fitohormon ten hamuje rozwój infekcji, organogenezę brodawek i wiązanie azotu [43]. Cytokiny modulując ekspresję genów *PIN* związanych z transportem IAA wpływają na rozwój korzeni bocznych u *Arabidopsis* i infekcję rizobiów u *M. truncatula* [32, 40]. Działanie CK zależy od stopnia wrażliwości tkanek na IAA. Nadekspresja *miRNA160* u *G. max*, skutkująca zwiększeniem kompetencji komórek na IAA negatywnie wpływa na ekspresję genów indukowanych przez CK [57].

Warto nadmienić, że istnieje mechanizm, który umożliwia wejście w symbiozę mimo niesprzyjającym ku temu warunkom, np. niewystarczająca ilość roślinnych CK. Wykazano, że indukcja podziałów komórek kory korzenia u *M. sativa* może być zainicjowana CK syntetyzowanymi także przez rizobia [8].

## **GIBERELINY**

Wiele doniesień wskazuje na wysoką zawartość giberelin podczas nodulacji, jednak należy zaznaczyć, że mogą one zarówno stymulować, jak i hamować ten proces. Są zaangażowane w skręcanie włókników, powstanie nici infekcyjnych i primordium brodawki oraz prawidłowe wykształcenie stref nodulacji [16]. Rozwojowi brodawek korzeniowych towarzyszy akumulacja transkryptów licznych genów kodujących enzymy zaangażowane w ich biosyntezę, co warunkuje odpowiednie stężenie giberelin w poszczególnych tkankach, niezbędne do uzyskania brodawek o prawidłowej strukturze. Podczas infekcji rizobiów, a także w późniejszej fazie rozwoju brodawek w lateralnej części korzeni *Sesbania rostrata* wyso-



kiej ekspresji ulega *SrGA20ox1* [27]. Ekspresja genów kodujących 20. i 3. oksydazy giberelinowe u *G. max* oraz *S. rostrata* zależy od czynnika Nod i zachodzi we wczesnych etapach inokulacji. Najwyższy poziom aktywności transkrypcyjnej obu genów zanotowano 12 godzin po indukcji [17]. W dojrzewających brodawkach *L. japonicus* stwierdzono natomiast akumulację transkryptu genu *LjGA2ox*, zaangażowanego w dezaktywację GA [23].

Mutanty *P. sativum* (*na*) z obniżonym poziomem giberelin w korzeniach charakteryzują się mniejszą ilością drobnych brodawek, pozbawionych leghemoglobiny i wykazujących wiele nieprawidłowości w budowie [12]. Nie wiadomo czy efekt ten wynika z bezpośredniego działania giberelin, czy np. wpływu inhibitora nodulacji – ET, którego produkcja u mutantu *na* jest podwyższona. Zahamowanie biosyntezy ET poprzez podanie aminoetoksywinyloglicyny (AVG), zwiększa ilość brodawek, jednak nie przywraca mutantom *na* dzikiego fenotypu, tak jak ma to miejsce po aplikacji GA. Uzyskane wyniki wskazują, że ich rola jest ściśle powiązana z ET i polega najprawdopodobniej na utrzymaniu odpowiednio niskiego stężenia tego fitohormonu. Podwójne mutanty *na* i genów autoregulacji nodulacji (*Psrdn1 – nod3*, *Psclv2 – sym28* oraz *Psnark – sym29*) wytwarzają dużą ilość brodawek wykazujących liczne zaburzenia rozwojowe, co oznacza, że GA działają niezależnie od AON, jednak są niezbędne dla prawidłowej morfogenezy tych struktur [13].

Wyciszenie genu *SLN* związanego z percepcją GA, podobnie, jak w przypadku deficytu tych fitohormonów, redukuje ilość powstałych brodawek. Egzogenne GA lub nadekspresja *SLEEPY1*, będącego elementem ich szlaku sygnałowego, negatywnie wpływają na nodulację u *L. japonicus* [31]. Wysoka zawartość GA u *M. sativa* wprawdzie hamuje wzrost korzenia, jednak stymuluje powstawanie brodawek. Wyniki tych badań potwierdzają, że prawidłowy przebieg nodulacji wymaga odpowiedniego stężenia GA, a jego optimum jest specyficzne dla różnych gatunków roślin.

U rizobiów tworzących brodawki o niezdeteminowaym typie rozwoju zidentyfikowano enzymy zaangażowane w szlak *ent*-kaurenu, co sugeruje możliwość syntezy GA przez te mikrosymbionty. Jednak ich wpływ na nodulację nie został jak dotąd szczegółowo opisany.

## **ETYLEN**

Etylen hamuje pojawiające się pod wpływem czynników Nod oscylacje zmian stężenia jonów  $CA^{2+}$ , blokuje deformację włóśników, wzrost nici infekcyjnych oraz samych brodawek korzeniowych. Wpływając na aktywność komórek merystematycznych może również decydować o typie powstających brodawek, np. u *S. rostrata* prowadzi do wytworzenia struktur o zdeterminowanym typie wzrostu. Brak ET powoduje u tego gatunku formowanie brodawek niezdeteminowanych

[27, 45]. Jednak powstanie brodawek oby typów wymaga prawidłowo funkcjonującego szlaku transdukcji sygnału ET [3, 36].

Infekcja wywołana przez rizobia stymuluje produkcję ET w brodawkach, a zastosowanie inhibitorów biosyntezy (AVG) lub działania ( $Ag^+$ ) tego fitohormonu, zwiększa ich liczbę. Mutacje w genach *ETHYLENE-INTENSIVE* (EIN2) i *MtEIN2*, kodujących białka zaangażowane w szlak transdukcji sygnału ET odpowiednio u *A. thaliana* i *M. truncatula*, skutkują nadmierną nodulacją. Uszkodzenie genu *LjEIN2a* u *L. japonicus* wywołuje jednak odwrotny efekt [6]. Po infekcji *Mesorhizobium loti* gatunek ten wykazuje podwyższoną aktywność transkrypcyjną genu *NIN* oraz wytwarza większą ilość nici infekcyjnych i zawiązków brodawek.

Wyniki badań prowadzonych u *L. japonicus* dowodzą, że inhibicyjny wpływ na nodulację może wywołać już sam prekursor ET – ACC. Co ciekawe, w genomie bakterii glebowych zidentyfikowano sekwencje kodujące deaminazę ACC (ACDS), która katalizuje przekształcenie prekursora ET do amoniaku i  $\alpha$ -keto-maślanu. Występowanie tego enzymu stanowi element lokalnej kontroli poziomu ACC w ryzosferze podczas symbiozy z *M. loti* lub *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Związek ten wytwarzany przez roślinę motylkowatą zostaje skutecznie zmetabolizowany wewnątrz bakterii, co ogranicza produkcję ET i w konsekwencji stymuluje nodulację, jak wykazano m.in. u *L. japonicus* i *P. sativum* [36].

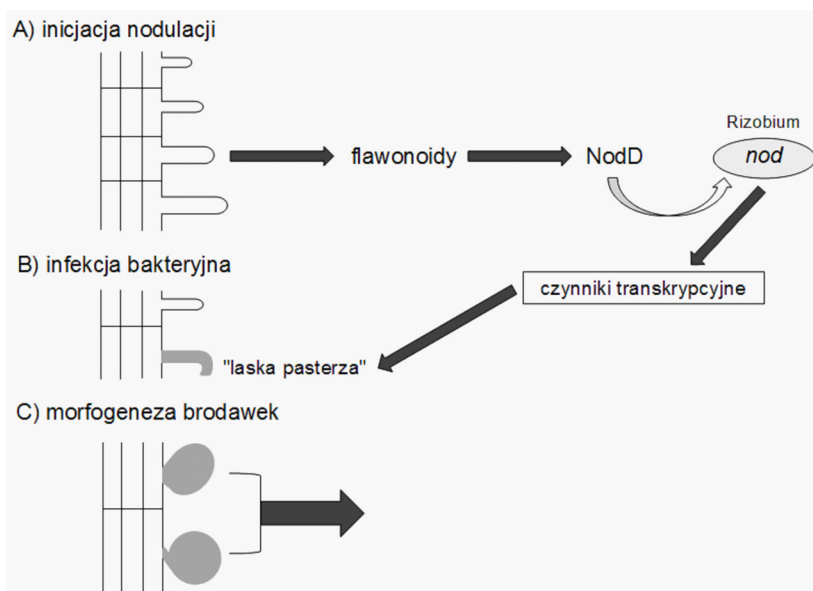
Proces brodawkowania zależy od wzajemnych interakcji pomiędzy ET i auksynami. Po inokulacji niewrażliwego na ET mutantu *M. truncatula* (*Mtskl*), charakteryzującego się wytwarzaniem nadmiernej liczby brodawek, obserwowano wzrost aktywności transkrypcyjnej genów *PIN1* i *PIN2* oraz akumulację IAA w miejscu zakażenia [42]. Przypuszcza się, że ET działa pośrednio indukując syntezę flawonoidów, które następnie modulują transport auksyn [5]. Ponadto ustalono, że mutacje w genach szlaku sygnałowego IAA, takich jak *ARF3a* (ang. *Auxin Response Factor*), *ARF3b* czy *ARF4* u *L. japonicus* skutkują zahamowaniem nodulacji [25]. Zastosowanie inhibitorów biosyntezy ET przywraca tym roślinom prawidłowy fenotyp.

## JASMONIANY

Egzogenny ester metylowy kwasu jasmonowego (ang. *Jasmonic Acid Methyl ester*, MeJA) podany na pęd mutantu *L. japonicus* *Ljhar1* wytwarzającego dużą liczbę brodawek, hamuje ekspresję genów *NIN* oraz formowanie nici infekcyjnych [36]. Podobny efekt fizjologiczny wywołuje kwas jasmonowy (ang. *Jasmonic Acid*, JA) u *M. truncatula*. Powoduje on zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  oraz obniża aktywność transkrypcyjną genów wczesnej nodulacji (*MtRIP1* i *MtENOD11*) [10, 52, 58].

Infekcja *G. max* rizobium hamuje biosyntezę JA [22]. Efektu tego nie obserwowano u mutantu *nts* (ang. *nitrate-tolerant symbiotic*), który efektywnie wiąże azot, a jego cechą fenotypową jest nadmierna nodulacja. Podanie tym roślinom inhibitora biosyntezy JA (galusanu n-propylu), zmniejsza ilość brodawek korzeniowych. W pewnych warunkach, np. po zadziałaniu światła czerwonego (Pr)/dalekiej czerwieni (Pfr) i jednoczesnej aplikacji JA u *L. japonicus*, fitohormon ten może stymulować nodulację. Defekt w receptorze fitochromu B (*phyB*) zmniejsza zawartość fotoasymilatów, koniugatu kwasu jasmonowego z izoleucyną (JA-Ile) oraz obniża stopień brodawkowania. Egzogenny JA jest wystarczający do przywrócenia *phyB* dzikiego fenotypu [54].

Nodulacja może być zainicjowana przez JA, który wytwarzany m.in. przez *Rhizobium Leguminosarum*, *Bradyrhizobium Japonicum* i *B. japonicum*, aktywuje mikrosymbiotyczne geny *NOD* [29, 30, 44]. Pozytywny wpływ tego związku na wiązanie azotu stwierdzono po preinokulacji *B. japonicum* i *R. leguminosarum* u *G. max* i *P. vulgaris* [41]. Co ciekawe, JAs jako cząsteczki sygnałowe zaangażowane w odpowiedź obronną roślin, uczestniczą również w interakcjach pomiędzy strączkowymi, rizobiami, a organizmami roślinożernymi. Bakterie podczas ataku patogenu powodują zmiany składu lotnych związków organicznych (ang. *Volatile Organic Compounds*, VOC) syntetyzowanych w odpowiedzi na JA, który jest wytwarzany przez gospodarza [1].



**RYCINA 1.** Schemat przedstawiający udział fitohormonów w kolejnych etapach nodulacji. Na podstawie [24], zmodyfikowane

**FIGURE 1.** Schematic presentation of phytohormones contribution in the subsequent stages of nodulation. Based on [24], modified

## PODZIĘKOWANIA

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Programu Wieloletniego MRiRW nr 222/2015

## LITERATURA

- [1] BALLHORN DJ, KAUTZ S, SCHÄDLER M. Induced plant defense via volatile production is dependent on rhizobial symbiosis. *Oecologia* 2013; **172**: 833-846.
- [2] BANO A, BALOOL R, DAZZO F. Adaptation of chickpea to desiccation stress is enhanced by symbiotic rhizobia. *Symbiosis* 2010; **50**: 129-133.
- [3] BENSMIHEN S. Hormonal control of lateral root and nodule development in legumes. *Plants* 2015; **4**: 523-547.
- [4] BISWAS B, CHAN PK, GRESSHOFF PM. A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol Plant* 2009; **2**: 487-499.
- [5] BUER CS, SUKUMAR P, MUDAY GK. Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **140**: 1384-1396.
- [6] CHAN PK, BISWAS B, GRESSHOFF PM. Classical ethylene insensitive mutants of the *Arabidopsis EIN2* orthologue lack the expected 'hypernodulation' response in *Lotus japonicus*. *J Integr Plant Biol* 2013; **55**: 395-408.
- [7] CHEN Y, CHEN W, LI X, JIANG H, WU P, XIA K, YANG Y, WU G. Knockdown of *LjIPT3* influences nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 2014; **55**: 183-193.
- [8] COOPER JB, LONG SR. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by transzeatin secretion. *Plant Cell* 1994; **6**: 215-225.
- [9] DING Y, KALO P, YENDREK C, SUN J, LIANG Y, MARSH JF, HARRIS JM, OLDROYD GED. Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 2008; **20**: 2681-2695.
- [10] DING Y, OLDROYD GED. Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal Behav* 2009; **4**: 89-93.
- [11] FERGUSON BJ, MATHESIU S. Signaling interactions during nodule development. *J Plant Growth Regul* 2003; **22**: 47-72.
- [12] FERGUSON BJ, ROSS JJ, REID JB. Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol* 2005; **138**: 2396-2405.
- [13] FOO E, FERGUSON BJ, REID JB. The potential roles of strigolactones and brassinosteroids in the auto-regulation of nodulation pathway. *Ann Bot* 2014; **113**: 1037-1045.
- [14] GIBSON KE, KOBAYASHI H, WALKER GC. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 2008; **42**: 413-441.
- [15] GONZALEZ-RIZZO S, CRESPI M, FRUGIER F. The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 2006; **18**: 2680-2693.
- [16] HAYASHI S, GRESSHOFF PM, FERGUSON BJ. Mechanistic action of gibberellins in legume nodulation. *J Integr Plant Biol* 2014; **56**: 971-978.
- [17] HAYASHI S, REID DE, LORENC M, STILLER J, EDWARDS D, GRESSHOFF PM, FERGUSON BJ. Transient Nod factor-dependent gene expression in the nodulation competent zone of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Plant Biotechnol J* 2012; **8**: 995-1010.
- [18] HAYAT S, AHMAD A. Soaking seeds of *Lens culinaris* with 28-homobrassinolide increased nitrate reductase activity and grain yield in the field in India. *Ann Appl Biol* 2003; **143**: 121-124.

- [19] HELD M, HOU H, MIRI M, HUYNH C, ROSS L, HOSSAIN MDS, SATO S, TABATA S, PERRY J, WANG TL, SZCZYGLOWSKI K. *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell* 2014; **26**: 678-694.
- [20] HIRSCH AM, BHUVANESWARI TV, TORREY JG, BISSELING T. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1244-1248.
- [21] JAKUBOWSKA A, KOWALCZYK S. Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. *Post Bioch* 1998; **44**: 72-82.
- [22] KINKEMA M, GRESSHOFF PM. Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact* 2008 **21**: 1337-1348.
- [23] KOUCHI H, SHIMOMURA K, HATA S, HIROTA, WU G, KUMAGAI H, TAJIMA S, SUGANUMA N, SUZUKI A, AOKI T, HAYASHIM, YOKOYAMA T, OHYAMA T, ASAMIZU E, KUWATA C, SHIBATA D, TABATA S. Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* 2004; **11**: 263-274.
- [24] LARANJO M, ALEXANDRE A, OLIVEIRA S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol Res* 2014; **169**: 2-17.
- [25] LI X, LEI M, YAN Z, WANG Q, CHEN A, SUN J, LUO D, WANG Y. The REL3-mediated TAS3 ta-siRNA pathway integrates auxin and ethylene signaling to regulate nodulation in *Lotus japonicus*. *New Phytol* 2014; **201**: 531-544.
- [26] LIANG Y, MITCHELL DM, HARRIS JM. Abscisic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula latd* mutant. *Dev Biol* 2007; **304**: 297-307.
- [27] LIEVENS S, GOORMACHTIG S, DEN HERDER J, CAPOEN W, MATHIS R, HEDDEN P, HOLSTER M. Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Physiol* 2005; **139**: 1366-1379.
- [28] LOHAR DP, SCHAFF JE, LASKEY JG, KIEBER JJ, BILYEU KD, BIRD DM. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J* 2004; **38**: 203-214.
- [29] MABOOD F, SMITH DL. Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiol Plant* 2005; **125**: 311-323.
- [30] MABOOD F, SOULEIMANOV A, KHAN W, SMITH DL. Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol Biochem* 2006; **44**: 759-765.
- [31] MAEKAWA T, MAEKAWA-YOSHIKAWA M, TAKEDA N, IMAIZUMI-ANRAKU H, MUROOKA Y, HAYASHI M. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J* 2009; **58**: 183-194.
- [32] MARHAVÝ P, BIELACH A, ABAS L, ABUZEINEH A, DUCLERCQ J, TANAKA H, PAŘEZOVÁ M, PETRÁŠEK J, FRIML J, KLEINE-VEHN J, BENKOVÁ E. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev Cell*. 2011; **21**: 796-804.
- [33] MATHESIUS U. Auxin: at the root of nodule development? *Funct Plant Biol* 2008; **35**: 651-668.
- [34] MORTIER V, WASSON A, JAWOREK P, DE KEYSER A, DECROOS M, HOLSTERS M, TARKOWSKI P, MATHESIUS U, GOORMACHTIG S. Role of *LONELY GUY* genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytol* 2014; **202**: 582-593.
- [35] MURRAY JD, KARAS BJ, SATO S, TABATA S, AMYOT L, SZCZYGLOWSKI K. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 2007; **315**: 101-104.
- [36] NAGATA M, SUZUKI A. Effects of Phytohormones on Nodulation and Nitrogen Fixation. W OHYAMA T ed. *Leguminous Plants. Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Intech. 2014; 111-128.
- [37] PALMA F, LÓPEZ-GÓMEZ M, TEJERA NA, LLUCH C. Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Sci* 2014; **223**: 16-24.
- [38] PECK MC, FISHER RF, LONG SR. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2006; **188**: 5417-5427.
- [39] PEER WA, BLAKESLEE JJ, YNAG H, MURPHY AS. Seven things we think we know about auxin transport. *Mol Plant* 2010; **4**: 487-504.

- [40] PLET J, WASSON A, ARIEL F, LE SIGNOR C, BAKER D, MATHESIUS U, CRESPI M, FRUGIER F. MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 2011; **65**: 622-633.
- [41] POUSTINI K, MABOOD F, SMITH DL. Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli pre-incubated with methyl jasmonate and/or genistein. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci* 2005; **55**: 293-298.
- [42] PRAYITNO J, ROLFE BG, MATHESIUS U. The ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiol* 2006; **142**: 168-180.
- [43] REID DE, HECKMANN AB, NOVÁK O, KELLY S, STOUGAARD J. CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE3 maintains cytokinin homeostasis during root and nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 2016; **170**: 1060-1074.
- [44] ROSAS S, SORIA R, CORREA N, ABDALA G. Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol Biol* 1998; **38**: 1161-1168.
- [45] RYU H, CHO H, CHOI D, HWANG I. Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Mol Cells* 2012; **34**: 117-126.
- [46] SASAKI T, SUZAKI T, SOYANO T, KOJIMA M, SAKAKIBARA H, KAWAGUCHI M. Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* 2014; **5**: 4983.
- [47] SCHNABEL E, JOURNET EP, CARVALHO-NIEBEL F, DUC G, FRUGOLI J. The *Medicago truncatula* SUNN gene encoding a CLV1-like receptor-like kinase regulates both nodule number and root length. *Plant Molec Biol* 2005; **58**: 809-822.
- [48] SHAHID MA, PERVEZ MA, BALAL RM, MATTSON NS, RASHID A, AHMAD R, AYYUB CM, ABBAS T. Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Aust J Crop Sci* 2011; **5**: 500-510.
- [49] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 425-448.
- [50] STASIAK G, MAZUR A, KOPER P, ŽEBRACKI K, SKORUPSKA A. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). *Post Mikrobiol* 2016; **55**: 289-299.
- [51] SUBRAMANIAN S, STACEY G, YU O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J* 2006; **48**: 261-273.
- [52] SUN J, CARDOZA V, MITCHELL DM, BRIGHT L, OLDROYD G, HARRIS JM. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allow integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* 2006; **46**: 961-970.
- [53] SUZUKI A, AKUNE M, KOGISO M, IMAGAMA Y, OSUKI K, UCHIUMI T, HIGASHI S, HAN SY, YOSHIDA S, ASAMI T, ABE M. Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 914-922.
- [54] SUZUKI A, SURIYAGODA L, SHIGEYAMA T, TOMINAGA A, SASAKI M, HIRATSUKA Y, YOSHINAGA A, ARIMA S, AGARIE S, SAKAI T, INADA S, JIKUMARU Y, KAMIYA Y, UCHIUMI T, ABE M, HASHIGUCHI M, AKASHI R, SATO S, KANEKO T, TABATA S, HIRSCH AM. *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16837-16842.
- [55] TERAKADO J, FUJIHARA S, GOTO S, KURATANI R, SUZUKI Y, YOSHIDA S, YONEYAMA T. Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by the application of brassinolide and brassinazole. *Soil Sci Plant Nutr* 2005; **51**: 389-395.
- [56] TOMINAGA A, NAGATA M, FUTSUKI K, ABE H, UCHIUMI T, ABE M, KUCHO K, HASHIGUCHI M, AKASHI R, HIRSCH AM, ARIMA S, SUZUKI A. Enhanced nodulation and nitrogen fixation in the abscisic acid low-sensitive mutant *enhanced nitrogen fixation1* of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 2009; **151**: 1965-1976.
- [57] TURNER M, NIZAMPATNAM NR, BARON M, COPPIN S, DAMODARAN S, ADHIKARI S, ARUNACHALAM SP, YU O, SUBRAMANIAN S. Ectopic expression of *miR160* results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiol* 2013; **162**: 2042-2055.

- [58] TYLMAN I, KOWALCZYK S. Receptory i szlaki sygnałowe regulujące symbiozę brodawkową i mikoryzę arbuskularną. *Post Biol Kom* 2012; **39**: 429-458.
- [59] UPRETI KK, MURTI GSR. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in French bean under water stress. *Biol Plant* 2004; **48**: 407-411.
- [60] VARDHINI BV, RAO SSR. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul* 1999; **28**: 165-167.
- [61] WASSON AP, PELLERONE FI, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by Rhizobia. *Plant Cell* 2006; **18**: 1617-1629.

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymano: 31.08.2017*

*Przyjęto: 14.09.2017*

*Agata Kućko*

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii*

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika*

*ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń*

*tel.: 0 56 6114461*

*fax: 0 56 6114772*

*e-mail: kuckoa@doktorant.umk.pl*

