

Rhizobium: Mikrobe des Jahres 2015

Knöllchensymbiose – wenn Pflanzen und Bakterien sich verstehen

ANKE BECKER

LOEWE-ZENTRUM FÜR SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT MARBURG

Rhizobia are a diverse group of bacteria engaged in nitrogen-fixing symbioses with leguminous plants. A prevalent interaction type results in root nodules colonized by the bacteria. Establishment and maintenance of this symbiosis involves specific recognition and coordinated differentiation of both bacterial and host cells driven by signal exchange. Characterization of this interplay reveals an impressive degree of specificity and fine-tuning resulting from million years of evolution.

DOI: 10.1007/s12268-015-0551-5
© Springer-Verlag 2015

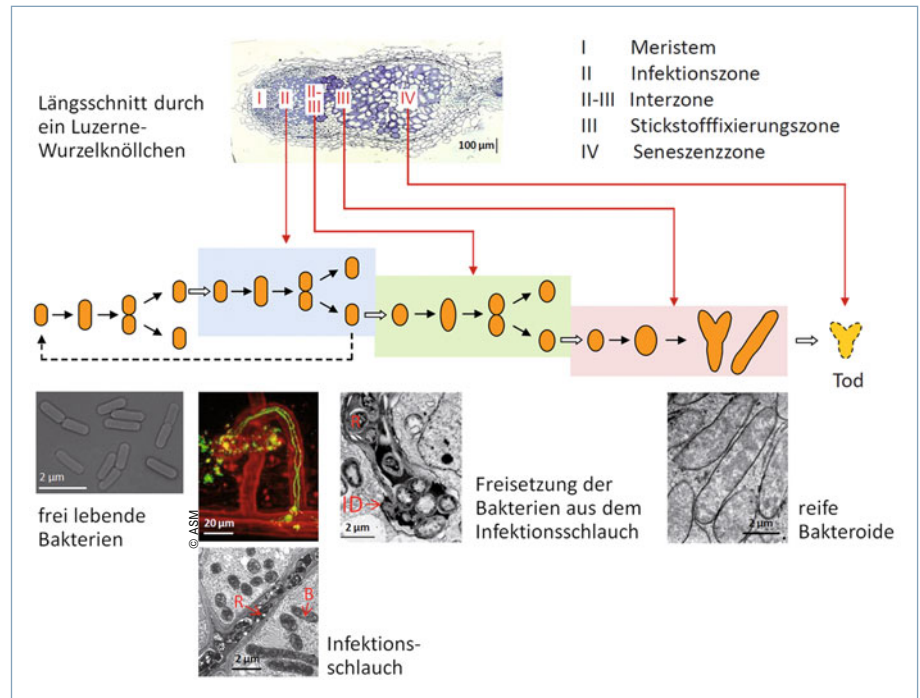
codierenden Genen zählen einige Rhizobien zur Spitzengruppe der Bakterien mit den größten Genomen.

Die meisten Bakterien besitzen ein einzelnes ringförmiges Chromosom. Dagegen sind bei den Rhizobien weit komplexere Genome verbreitet [2]. Besonders in der Familie der Rhizobiaceae ist das Genom auf bis zu sieben große ringförmige DNA-Moleküle aufgeteilt: das Hauptchromosom und mehrere Chromosomen-ähnliche Megaplas-mide oder Chromide [3]. Diese Genomorganisation ist mit der Architektur von Smartphones vergleichbar: Das Hauptchromosom

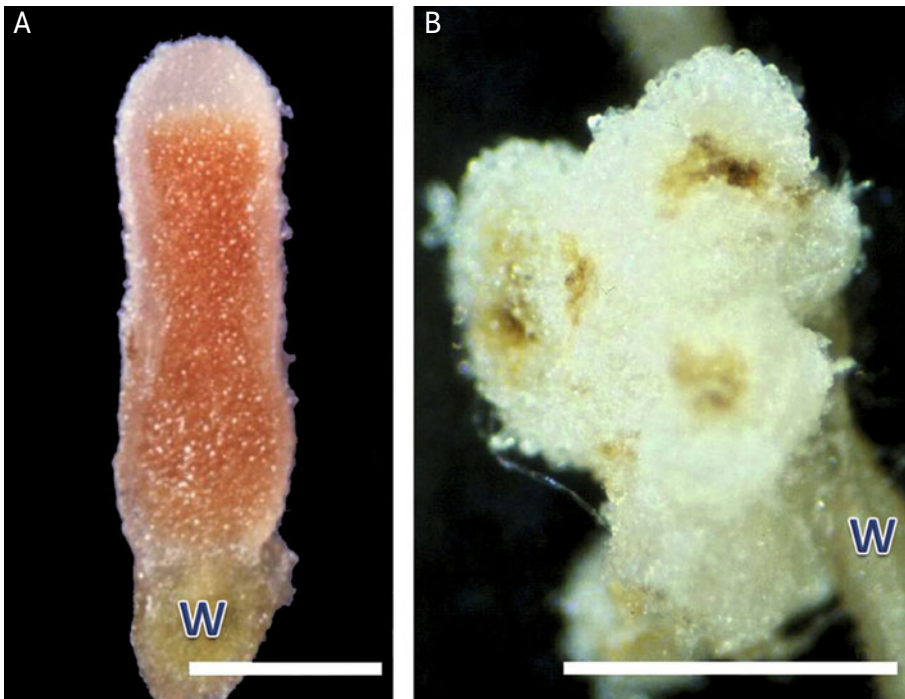
■ Alle Organismen benötigen Stickstoff, vor allem als wichtigen Bestandteil von Proteinen und Nukleinsäuren. Eine besonders geschickte Form der Stickstoffversorgung nutzen Leguminosen (Hülsenfrüchtler), die mit Rhizobien eine Knöllchensymbiose eingehen (siehe auch S. 232 in dieser Ausgabe) [2, 3]. Sie ist ökologisch vorteilhaft, da Rhizobien atmosphärischen Stickstoff (N_2) fixieren und den Leguminosen – die für die Ernährung von Mensch und Tier wertvolle proteinreiche Samen produzieren – Wachstum ohne zusätzliche Stickstoffdüngung erlaubt.

Rhizobien sind divers und haben große Genome

Bakterien, die eine Knöllchensymbiose eingehen können, sind phylogenetisch divers. Sie zählen zu den Alpha- und Betaproteobakterien [1]. Darüber hinaus können einige Actinobakterien der Gattung *Frankia* eine solche Beziehung eingehen [1]. Gemeinsam ist allen Rhizobien der Wechsel zwischen frei lebendem und symbiontischem Lebensstil (**Abb. 1**), wobei sie insbesondere im Boden vielfältigen und häufig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Um diesen unterschiedlichen Anforderungen gerecht zu werden, sind rhizobielle Genome recht groß und genetisch divers. Mit bis zu neun Millionen Basenpaaren und über 8.000 Protein-



▲ **Abb. 1:** Frei lebende und Pflanzenstadien von Rhizobien. Oben: Zonierung eines Wurzelknöllchens der Luzerne im Längsschnitt. Die Zonen repräsentieren die unterschiedlichen Entwicklungsstufen des kontinuierlich durch die Aktivität des apikalen Meristems wachsenden Wurzelknöllchens. Unten: Stadien der Rhizobien während der Knöllchenentwicklung in den verschiedenen Zonen. Frei lebende Bakterien und Bakterien in den Infektionsschläuchen sind teilungsfähig, während Bakterioide diese Fähigkeit terminal verloren haben. B: Bakteroid, umschlossen von der Peribakteroidmembran; R: *Rhizobium* im Infektionsschlauch; ID: Infektionströpfchen (Fotos: Gage D et al., *J Bacteriol* (1996) 178:7159–7166; © ASM; K. Niehaus, D. Kapp, Bielefeld; H. Küster, Hannover).



▲ **Abb. 2:** Wurzelknöllchen der Luzerne, die durch den *Sinorhizobium meliloti*-Wildtyp (A) und eine Exopolysaccharid-Biosynthese-Mutante (B) induziert wurden. A, Das durch den Wildtyp besiedelte Knöllchen weist eine durch Leghämoglobin rot gefärbte symbiotische Zone auf. B, Das Knöllchen enthält keine Rhizobien, da die *S. meliloti*-Exopolysaccharid-Biosynthese-Mutante nicht in der Lage ist, Knöllchen zu besiedeln. Dieses Knöllchen zeigt als Symptome der Pflanzenabwehr braune nekrotische Bereiche, und es fehlt die Leghämoglobin-Färbung aktiv N_2 -fixierender Knöllchen. W: Wurzel; Längsbalken: 1 mm (Fotos: Karsten Niehaus, Bielefeld).

enthält überwiegend das Kerngenom, vergleichbar mit dem Betriebssystem, während die Megaplasmide oder Chromide fast ausschließlich akzessorische Gene enthalten (Apps), die für ein breites Repertoire zusätzlicher metabolischer oder symbiontischer Eigenschaften verantwortlich sind [4]. Die Ausstattung mit akzessorischen Genen ist sehr variabel. Sie werden durch horizontalen Genaustausch erworben, also wie Apps aus dem mikrobiellen Genpool „heruntergeladen“. Dieser Genfluss in mikrobiellen Populationen im Boden ist für die große Vielfalt und die weite Verbreitung der Rhizobien verantwortlich.

Beide Partner müssen sich verstehen

Die Knöllchensymbiose ist eine hochspezifische Interaktion. Knöllchen werden nur an den Wurzeln der für den Mikrosymbionten jeweils spezifischen Wirtspflanzen induziert und besiedelt, wobei die gegenseitige Erkennung auf einem Austausch von Signalen zwischen beiden Partnern beruht [5]. Die Entwicklung eines Wurzelknöllchens ist am Beispiel der Interaktion von *Sinorhizobium meliloti* mit der Luzerne in **Abbildung 1** schematisch

dargestellt. Diese Knöllchen wachsen kontinuierlich, wodurch alle Entwicklungsstadien nebeneinander in einem Knöllchen vertreten sind. Diese spiegeln sich in der Zonierung des Knöllchens wider (**Abb. 1**). An der Spitze befindet sich ein dauerhaftes Bildungsgewebe (Meristem), das für das Knöllchenwachstum verantwortlich ist. Darauf folgen die Infektionszone mit den Infektionsschläuchen und die Interzone, in der sich die Bakterien nach Freisetzung aus den Infektionsschläuchen zum N_2 -fixierenden Stadium entwickeln. Die N_2 -Fixierung erfolgt in der durch Leghämoglobin rot gefärbten symbiotischen Zone, die in die Alterungszone (Seneszenzzone) übergeht, in der die N_2 -Fixierungsleistung abnimmt.

Zunächst werden die Rhizobien durch Wurzelausscheidungen in die Rhizosphäre gelockt. Der spezifische molekulare Dialog beginnt mit der Induktion der *nod* (Nodulations)-Genexpression in den Bakterien durch Flavonoide, die von der Wirtspflanze sekretiert werden. Nod-Faktoren sind Lipochitooligosaccharide, die aus einem β -1,4-verknüpften N-Acyl-D-glukosamin-Grundgerüst und verschiedenen Substituenten aufgebaut

sind. Unterschiede in den Substituenten sind u. a. für die Wirtsspezifität verantwortlich [5]. Die Nod-Faktoren werden von spezifischen Rezeptorkinasen des Wirts erkannt und induzieren eine Wurzelhaarkrümmung und die Bildung des Infektionsschlauchs, über den die Bakterien in das Wurzelhaar eindringen, sowie Zellteilungen in der Wurzelrinde, die schließlich zur Bildung des Knöllchengewebes führen (**Abb. 1**).

Eine wichtige Rolle spielen Oberflächen-Polysaccharide der Bakterien. Sie unterdrücken Abwehrreaktionen der Pflanze und sind entweder mit der Zelle verbunden, wie die Lipopolysaccharide und die kapsulären Polysaccharide, oder werden als Exopolysaccharide (EPS) sekretiert [6]. So sind Rhizobien, die keine die Pflanzenabwehr unterdrückenden Polysaccharide mehr synthetisieren können, nicht mehr in der Lage, die Knöllchen zu besiedeln. Diese bleiben nun klein, enthalten keine Bakterien und weisen nekrotische braune Bereiche an der Oberfläche als Anzeichen der Pflanzenabwehr auf (**Abb. 2**). Auch die Unterdrückung der Pflanzenabwehr ist ein hochspezifischer Prozess: Spezifische rhizobielle Polysaccharide sind nur während der Besiedelung der für diese empfänglichen Wirtspflanzen wirksam. Rhizobien mit weitem Wirtsbereich sind „mehrsprachig“: Sie erkennen und besitzen ein großes Repertoire an Signalmolekülen, die ihnen die symbiotische Interaktion mit vielen verschiedenen Wirtspflanzen ermöglichen. Dagegen gehen Rhizobien mit engem Wirtsbereich nur mit einer oder wenigen Leguminosen eine Symbiose ein.

Domestizierung der Rhizobien

Bei der Entlassung der Bakterien aus dem Infektionsschlauch werden diese in einem endozytotischen Prozess in die von der Plasmamembran der Wurzelhaarzellen abstammende Peribakteroidmembran eingeschlossen und differenzieren anschließend zu N_2 -fixierenden Bakteroiden (**Abb. 1**). Deren Genexpressionsmuster unterscheidet sich deutlich vom Profil im frei lebenden Stadium [7]. Abhängig von der Wirtspflanze ist die Differenzierung unterschiedlich ausgeprägt. So können Bakterioide der Sojabohne nach Freisetzung aus dem Knöllchen in das frei lebende Stadium zurückkehren und sind wieder vermehrungsfähig. Dagegen induzieren einige Wirtspflanzen aus der Gruppe der IRLC (*inverted repeat lacking clade*)-Leguminosen, wie Luzerne, Erbse, Linse und Ackerbohne, eine terminale Differenzierung der

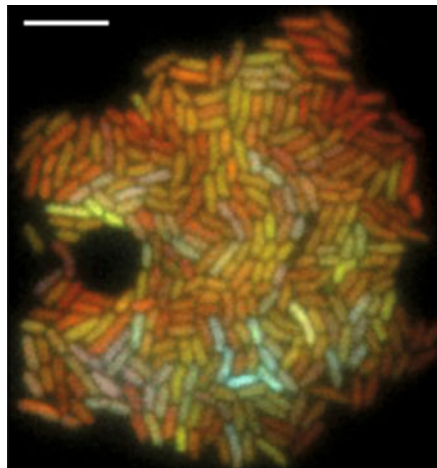
Bakteroide. Diese führt zu vergrößerten, teilweise verzweigten polyploiden Bakteroiden mit veränderten Membraneigenschaften, die nicht mehr teilungsfähig sind und nicht mehr in das frei lebende Stadium gelangen können (Abb. 1).

Die Bakterien werden durch Pflanzenpeptide zur terminalen Differenzierung gezwungen [8–10]: Knöllchenspezifische Cystein-reiche (NCR) Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften gelangen in die bakterielle Membran und das Zytoplasma und lösen die Differenzierung aus. Mit diesen Peptiden haben die IRLC-Leguminosen eine weitere Stufe der Kontrolle des Symbiosepartners erworben und die Rhizobien domestiziert. In dieser Interaktion können die Rhizobien nur aus den nicht-symbiotischen Knöllchenzonen, die noch undifferenzierte Bakterien enthalten, in den Boden zurückkehren.

Rhizobien verstehen sich auch untereinander

Für Rhizobien ist nicht nur der molekulare Dialog mit der Wirtspflanze von Bedeutung. Für das Überleben im Boden ist die Kommunikation zwischen den Individuen der rhizobiellen Population ebenso wichtig. Diese Kommunikation ermöglicht koordiniertes Verhalten. Hierzu zählt die Anheftung an Oberflächen und Biofilmbildung. Da bakterielle Zell-Zell-Kommunikation besonders bei hohen lokalen Populationsdichten auftritt, wird diese Form der Kommunikation als *Quorum sensing* (QS) bezeichnet. *N*-Acylhomoserinlaktone (AHLs) sind bei Gram-negativen Bakterien weit verbreitete QS-Signale, die auch von Rhizobien genutzt werden.

Das QS kontrolliert eine Vielzahl an Genen. Hierzu zählt z. B. bei *S. meliloti* die Unterdrückung der Motilität und die Induktion der EPS-Produktion [11]. Im frei lebenden Stadium tragen diese Polysaccharide zum Schutz der Zelle bei. Sie werden sekretiert und kommen daher der gesamten Population zugute, auch wenn sie nicht von allen Zellen produziert werden. Mithilfe von Fluoreszenzreportern konnten wir zeigen, dass in einer *S. meliloti*-Population nicht alle Zellen zur Produktion beitragen. Sie spaltet sich in drei Subpopulationen auf, die nichts, wenig oder viel beitragen (Abb. 3, [12]). Dieses Phänomen ist als phänotypische Populationsheterogenität bekannt und trägt zu Überlebensstrategien wie Arbeitsteilung und Risikoverteilung bei, deren Bedeutung auch für die symbiotischen Rhizobien immer mehr in den Fokus der Forschung rückt.



▲ **Abb. 3:** *Sinorhizobium meliloti*-Kolonie. Die Zellen tragen Promotor-Fluoreszenzgenfusionen zur Anzeige der Expression eines Exopolysaccharid-Biosynthese-Gens (*wgeA*-Promotor-*cerulean*, blau), des AHL-Synthase-Gens (*sinI*-Promotor-*mVenus*, gelb) und eines konstitutiven Markers (T5-Promotor-*mCherry*, rot). Die Individuen der klonalen Population unterscheiden sich untereinander in der Expression dieser Gene. Längsbalken: 5 µm.

Übertragung auf Nutzpflanzen?

Da Rhizobien atmosphärischen Stickstoff fixieren und somit den für unsere Ernährung wichtigen Leguminosen natürlichen Dünger zur Verfügung stellen, ist es attraktiv darüber nachzudenken, ob man diese Symbiose nicht auch auf andere Nutzpflanzen synthetisch übertragen kann. Doch das Wurzelknöllchen ist ein hoch entwickeltes Pflanzenorgan. Seine Entwicklung in der Interaktion mit den besiedelnden Rhizobien ist das Ergebnis eines langen Evolutionsprozesses, bei dem Signalaustausch und metabolisches Zusammenspiel fein aufeinander abgestimmt wurden. Leguminosen besitzen die spezifischen Rezeptoren und Signaltransduktionswege, die diese symbiotische Interaktion ermöglichen. Aufgrund der Komplexität des molekularen Dialogs zwischen beiden Partnern liegt eine Übertragung dieser Fähigkeit auf andere Nutzpflanzen noch in

weiter Ferne, obwohl das schnell zunehmende Wissen über die molekularen Grundlagen heute schon erste Schritte im Hinblick auf dieses Langzeitziel ermöglicht [13]. ■

Literatur

- [1] Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X et al. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17:458–466
- [2] Becker A (2009) Functional Genomics of Rhizobia. In: Pawlowski K (Hrsg) *Prokaryotic Symbionts in Plants* (Microbiology Monographs, Vol. 8). Springer, Heidelberg, 71–100
- [3] Harrison PW, Lower RP, Kim NK et al. (2010) Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol* 18:141–148
- [4] Kumar N, Lad G, Giuntini E et al. (2015) Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biol* 5:140133
- [5] Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42:413–441
- [6] Krol E, Becker A (2009) Surface polysaccharides as fitness factors of nitrogen-fixing plant-associated bacteria. In: Ullrich M (Hrsg) *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, S 189–211
- [7] Becker A, Bergès H, Krol E et al. (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 17:292–303
- [8] Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A et al. (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327:1122–1126
- [9] Wang D, Griffiths J, Starker C et al. (2010) A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* 327:1126–1129
- [10] Terpolilli JJ, Hood GA, Poole PS (2012) What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* 60:325–389
- [11] Charoenpanich P, Meyer S, Becker A et al. (2013) Temporal expression program of quorum sensing-based transcription regulation in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 195:3224–3236
- [12] Schlüter J-P, Czuppon P, Schauer O et al. (2015) Classification of phenotypic subpopulations in isogenic bacterial cultures by triple promoter probing at single cell level. *J Biotechnol* 198:3–14
- [13] Rogers C, Oldroyd GE (2014) Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot* 65:1939–1946

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Anke Becker
 LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie
 Philipps-Universität Marburg
 Hans-Meerwein-Straße 6
 D-35032 Marburg
 Tel.: 06421-28-24451
 Fax: 06421-28-22229
 anke.becker@synmikro.uni-marburg.de
 www.synmikro.com

AUTORIN



Anke Becker

1986–1994 Biologiestudium und Promotion, Universität Bielefeld. 1995–2000 Forschungsgruppenleiterin, Universität Bielefeld. 1999 Gastwissenschaftlerin, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA. 2000–2007 Hochschuldozentin, Universität Bielefeld. 2008–2011 Professorin für Systembiologie der Prokaryoten, Universität Freiburg. Seit 2011 Professorin für Vergleichende Genomik von Mikroorganismen, Universität Marburg.