

HANNA DAHM

Bakterie towarzyszące mikoryzom i ich rola w funkcjonowaniu symbiozy

Bacteria associated with mycorrhizae and their role in the functioning of symbiosis

ABSTRACT

Dahm H. 2009. Bakterie towarzyszące mikoryzom i ich rola w funkcjonowaniu symbiozy. Sylwan 153 (2): 134-139.

This paper presents influence of rhizosphere bacteria on the physiological relations between roots of trees and mycorrhizal fungi, considering mainly positive role of bacteria (mycorrhization helper bacteria).

KEY WORDS

ectomycorrhiza, mycorrhization helper bacteria

ADDRESSES

Hanna Dahm – e-mail: dahm@biol.uni.torun.pl

Zakład Mikrobiologii; Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej; Uniwersytet M. Kopernika; ul. Gagarina 9; 87-100 Toruń;

Wstęp

Funkcjonowanie ektomikoryz na korzeniach drzew ulega wpływom populacji mikroorganizmów ryzosferowych zarówno tych, które mogą mieć pozytywny, jak i negatywny wpływ na tworzenie takich asocjacji. Bakterie, które wywierają wpływ pozytywny, nazywane są bakteriami wspomagającymi mikoryzy (ang. Mycorrhization Helper Bacteria, MHB). Garbaye [1994] określił MHB jako glebowe bakterie związane z niektórymi mikoryzowymi grzybami i stymulujące rozwój mikoryzowej symbiozy.

Wydzieliny korzeniowe zawierają wiele niskocząsteczkowych, łatwo przyswajalnych związków węglowych, dostępnych dla mikroorganizmów glebowych. To jest przyczyną, że najwięcej i największą różnorodność populacji mikroorganizmów obserwuje się w strefie korzeniowej, w ryzosferze. Ryzosfera różni się od gleby pozakorzeniowej również właściwościami fizykochemicznymi: niższe pH (wypompowywanie z korzeni protonów, połączone z pobieraniem kationów, wytwarzanie kwasów organicznych), niższa zawartość tlenu, a wyższa CO₂ (oddychanie korzeni i drobnoustrojów), wyższe stężenie rozpuszczalnych węglowodanów, które mogą stanowić do 40% zasymilowanego węgla przez części nadziemne rośliny. Z niektórych składników wydzielin korzeniowych korzysta grzyb ektomikoryzowy, a ponadto modyfikuje on funkcje korzenia, jego wydzieliny oraz drobnoustroje zasiedlające tę strefę. Wspecjalizowane organizmy mikoryzosferowe, zasiedlające zmodyfikowaną przez grzybowego symbionta strefę korzeniową, są całkowicie zależne od prostych związków wydzielanych przez korzeń, modyfikowanych przez symbiotycznego grzyba oraz od jego wydzielin.

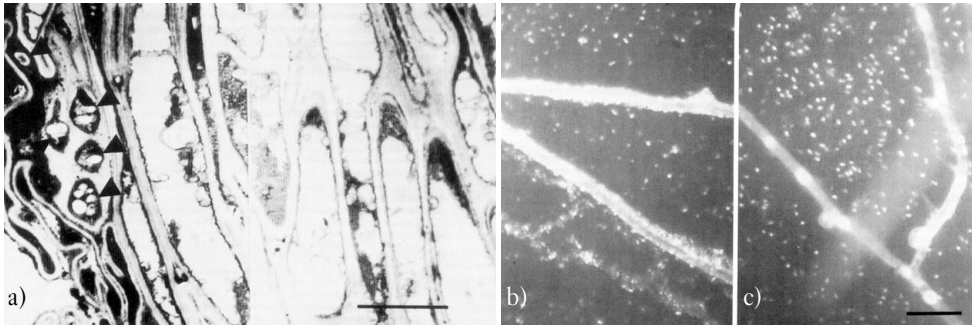
Bakterie i inne drobnoustroje zasiedlające glebę i mikoryzosferę oddziałują na siebie i na grzyby mikoryzowe w różnych stadiach ich rozwoju, tzn. w czasie ich rozwoju w glebie, wzdłuż korzenia i w czasie infekowania korzeni krótkich. Niektóre z tych interakcji mogą być negaty-

wne (hamowanie wzrostu grzyba mikoryzowego przez drobnoustroje), jednakże znaczna część bakterii mikoryzosfery stymuluje wzrost grzyba i infekcję mikoryzową. Według Lindermanna [1988] istnieją następujące problemy do rozstrzygnięcia: (1) czy wszelkie zmiany w roślinie mikoryzowej są powodowane tylko przez grzyba mikoryzowego, czy też przez inne pożyteczne drobnoustroje mikoryzosfery, lub też przez oba te składniki, (2) czy wzmożone pobieranie fosforu przez mikoryzy jest funkcją zwiększonego potencjału absorpcyjnego grzybni ekstramatrykalnej, czy też wynikiem łącznego działania grzybni i związanych z nią bakterii rozpuszczających fosforany, lub (3) czy obniżenie poziomu infekcji korzeni przez patogeny glebowe wynika z aktywności metabolicznej grzyba ektomikoryzowego, czy powodują to bakterie związane z grzybnią [Strzelczyk 1998].

Liczba prac wyjaśniających mechanizmy związane z oddziaływaniem bakterii pomocniczych na symbiozę mikoryzową wciąż jest niewystarczająca. Bowen i Theodoru [1979] wykazali, że w warunkach *in vitro* niektóre bakterie glebowe i ryzosferowe oddziaływały na grzyba ektomikoryzowego *Rhizopogon luteolus* wzdłuż młodych korzeni *Pinus radiata* i że wpływ ten, zależnie od szczepu, był pozytywny lub negatywny. Wykazano, że niektóre gleby bardziej sprzyjają powstawaniu mikoryz niż inne. Garbaya i Bowen [1987] zaobserwowali, że tworzenie mikoryzy było ściśle związane ze stanem mikrobiologicznym środowiska i że grzyby mikoryzowe (*Paxillus involutus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Rhizopogon luteolus*) reagowały różnie na mikroflorę towarzyszącą, co może świadczyć o istnieniu specyficznej interakcji. Marx i in. [1984] zanotowali, że zainfekowane grzybami i bakteriami inokulum *Pisolithus tinctorius* było niekiedy wydajniejsze w tworzeniu mikoryz niż grzybnia sterylna. Te wyniki wskazują na istnienie interakcji pomiędzy mikroflorą glebową a grzybem ektomikoryzowym.

Garbaya i Bowen [1989] postulowali, że bakterie, które prawdziwie wspomagają mikoryzy, powinny być przystosowane do życia w asocjacji z grzybem rozwijającym się w jego bliskości, tj. w mufce (w przypadku grzybów ektomikoryzowych). Bakterie takie izolowano z powierzchniowo wysterylizowanych ektomikoryz utworzonych przez *Rhizopogon luteolus* na korzeniach *Pinus radiata*. Wpływały one pozytywnie na tworzenie się mikoryz na korzeniach tych siewek i występowały w liczbie 10^6 cfu na jeden gram świeżej masy mikoryz. Były to przeważnie fluoryzujące bakterie rodzaju *Pseudomonas*. Wśród nich były też takie szczepy, które nie wywierały żadnego wpływu na tworzenie mikoryz lub hamowały ich rozwój. Duponnois i Garbaya [1991] na podstawie wyników badań przeprowadzonych *in vitro*, badań szklarniowych i w szkótkach twierdzą, że zdolność do stymulowania rozwoju mikoryz jest właściwością szczepową, niezależną od jakiegokolwiek interakcji w obrębie populacji drobnoustrojów. Zgłębiając ten problem, Garbaya [1994] postulował, że bakterie wspomagające mikoryzy (MHB) są specyficzne i selektywne dla grzyba, ale nie dla drzewa. Wykazał, że określone bakterie związane z grzybem ektomikoryzowym *Laccaria laccata* wspomagały rozwój ektomikoryz przez tego grzyba na korzeniach różnych drzew (*Picea abies*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*), a nawet na korzeniach drzewa okrytozalążkowego *Quercus robur* (fot.).

Wielu badaczy, z różnych struktur ektomikoryz izolowało bakterie rodzaju *Pseudomonas* [Garbaya, Bowen 1989; Frey i in. 1997]. Jednakże Timonen i in. [1998] badając mikroorganizmy towarzyszące mikoryzom utworzonym przez *Suillus bovinus* na korzeniach *Pinus sylvestris* w starodrzewie i w szkółce leśnej, wykazali, że dominującą grupą bakterii w starodrzewie były pałeczki Gram-ujemne, takie jak *Capnocytophaga*, *Erwinia*, *Pasteurella*, *Sphingobacterium*, *Vibrio* czy *Xanthomonas*. Bakterie zasiedlające mikoryzy w szkółce leśnej należały do takich rodzajów jak *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* oraz *Xanthomonas*. Bakterie gatunku *Pseudomonas fluorescens* zasiedlały różne części strukturalne obu mikoryz, jednakże nie występowały na/w sznurach grzybniowych. Inni badacze [Duponnois, Garbaya 1990; Duponnois 1992]



Fot.

Poprzeczny przekrój przez mufkę ektomikoryzy utworzonej przez *Laccaria laccata* na korzeniach siewek *Pseudotsuga menziesii* (strzałki wskazują bakterie zlokalizowane na powierzchni mufki) (a) oraz grzybnia *Laccaria laccata* i dwa szczepy bakterii ryzosferowych, przelegający (b) i nieprzylegający (c) do grzybni

Cross-section of the mantle of an ectomycorrhiza formed by *Laccaria laccata* with a *Pseudotsuga menziesii* (arrows show bacteria embedded in the outer mantle) (a) as well as mycelium of *Laccaria laccata* and two isolates of rhizosphere bacteria adhering (b) or not (c) to the hyphae [Garbaye 1994]

z ektomikoryz utworzonych przez *Laccaria laccata*, oprócz fluoryzujących bakterii rodzaju *Pseudomonas* wyizolowali również przedstawicieli rodzaju *Bacillus*. Nie wszystkie jednak bakterie stymulowały rozwój mikoryz, zwiększając indeks mikoryzowy (procent krótkich korzeni mikoryzowych). Taką cechą wykazywało 50% wyizolowanych szczepów.

Obserwując różne oddziaływania mikroorganizmów zasiedlających mikoryzosferę na grzyba mikoryzowego, Garbaye [1991] wyróżnił pięć grup troficznych:

- (1) typowe drobnoustroje saprotroficzne, podobne do występujących poza strefą korzeni, wykorzystujące jako źródło węgla związki organiczne, takie jak ligniny, białka, glikoproteiny, celulozę i inne polisacharydy,
- (2) drobnoustroje charakterystyczne dla mikoryzosfery, zależne od prostych związków organicznych wydzielanych przez roślinę i grzybowego symbionta; konkurują one ze sobą oraz patogenami i symbiontami zasiedlającymi powierzchnię korzenia; należą do nich m.in. ryzobakterie rodzaju *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Azospirillum*; niektóre z tych bakterii mają zdolność wiązania azotu atmosferycznego,
- (3) patogeny korzeniowe; drobnoustroje biotroficzne, które wnikając do tkanek korzenia niszczą je; rozwój tych mikroorganizmów w dużym stopniu zależy od czynników środowiskowych, wydzielin korzeniowych oraz aktywności bakterii rozwijających się na powierzchni korzeni roślin; są to zarówno bakterie, jak i grzyby,
- (4) symbionty korzeniowe, które są mikroorganizmami ściśle związanymi z korzeniami roślin; często wykazują zdolność wiązania azotu atmosferycznego,
- (5) drapieżna mikrofauna (pierwotniaki, skoczogonki), która żeruje na w/w drobnoustrojach, hamując ich aktywność i redukując ich liczebność.

Mechanizmy uczestniczące w oddziaływaniach MHB na symbiozę mikoryzową

Główne hipotezy dotyczące mechanizmu oddziaływania MHB na symbiozę mikoryzową, przedstawione przez Garbaye [1991] dotyczą trzech głównych etapów: (1) saprotroficznego wzrostu grzyba w glebie, (2) mechanizmów rozpoznania pomiędzy grzybowym symbiontem i rośliną gospodarza, (3) wrażliwością rośliny na infekcję grzybową.

WPLYW MHB NA WZROST GRZYBA. Hipoteza zakłada, że bakterie stymulują wzrost grzyba w saprotroficznym, przedsymbiotycznym stadium w ryzosferze lub na powierzchni korzenia. Jest to zagadnienie bardzo złożone, a wyniki uzyskane z doświadczeń *in vitro* są trudne do interpretacji, głównie z tego powodu, że warunki, nawet doskonałych eksperymentów laboratoryjnych, nie odzwierciedlają uwarunkowań i oddziaływań w naturalnym środowisku ryzosferowym. Jednakże liczne badania nad oddziaływaniem grzyba ektomikoryzowego i MHB wykazały, że metabolity wytwarzane przez bakterie mogą być wykorzystywane przez grzyba jako pokarm lub mogą intensyfikować jego anabolizm [Duponnois 1992; Garbaye 1998]. Niektóre kwasy organiczne (jabłkowy, cytrynowy), wydzielane przez MHB są dobrym źródłem węgla dla grzybów ektomikoryzowych. We wzajemnych oddziaływaniach bakterii i grzybów duże znaczenie mają też związki lotne, z których najważniejszą rolę odgrywa CO₂. Wykazano, że zależnie od stężenia, CO₂ może stymulować lub hamować wzrost różnych grzybów [Le Tacon i in. 1983; Staatsma i in. 1986]. W podobnych oddziaływaniach może uczestniczyć też etylen oraz amoniak, aminy, alkohole, związki siarki lub niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe [Duponnois 1992]. Ponadto ważnym czynnikiem w oddziaływaniach MHB na grzyby mikoryzowe jest dostarczanie grzybom azotu.

Już we wczesnych badaniach ektomikoryz stwierdzono, że niektóre diazotroficzne bakterie wyizolowane z ektomikoryz stymulowały wzrost grzyba przez uwalnianie amoniaku. Wielu badaczy wykazało, że bakterie wiążące azot atmosferyczny były związane z ektomikoryzami lub owocnikami grzybów ektomikoryzowych [Li, Castellano 1984; Li i in. 1992; Różycki i in. 1999].

Inną możliwością oddziaływania bakterii wspomagających mikoryzy na grzyby ektomikoryzowe jest detoksyfikacja środowiska. Wykazano w warunkach *in vitro*, że metabolity wydzielane i gromadzone w podłożu hodowlanym (np. ciemno zabarwione związki fenolowe), które ograniczały wzrost grzyba, były rozkładane przez bakterie. Trudne do interpretacji, chociaż z pewnością występujące w naturalnym środowisku, jest zjawisko modyfikacji ryzosfery przez MHB. Metaboliczna aktywność bakterii modyfikuje właściwości fizyko-chemiczne gleby, często ułatwiając mikoryzową infekcję. Znaczący udział w tej modyfikacji mają zmiany pH oraz kompleksowanie jonów przez wytwarzanie sideroforów.

Ostatnią rozpatrywaną hipotezą jest wpływ MHB na kiełkowanie grzybowych zarodników. W środowisku naturalnym jest to pierwszy etap prowadzący do tworzenia mikoryz. Jednakże w przypadku basidiospor grzybów ektomikoryzowych, substancje uczestniczące w tym procesie nie są dokładnie znane.

WPLYW MHB NA ROZPOZNANIE RELACJI KORZEŃ-GRZYB. Zgodnie z tą hipotezą bakterie mogą uczestniczyć w oddziaływaniach pomiędzy rośliną a grzybem, głównie w pierwszych etapach nawiązywania symbiozy. Do takich chemicznych związków sygnałnych, wytwarzanych zarówno przez makro-, jak i mikrosymbionta zalicza się związki fenolowe, enzymy, lektyny, polisacharydowe lub glukoproteinowe fibryle (ułatwiające przyleganie), związki lotne i fitohormony. Budowa molekularna ściany komórkowej obu partnerów również może mieć znaczenie w początkowym etapie symbiozy.

Uważa się, że bakterie uczestniczą w tych oddziaływaniach potencjalnych partnerów, modyfikując substancje – mediatory oraz zmieniając właściwości ścian komórkowych, ułatwiając nawiązanie symbiozy.

WPLYW MHB NA RECEPTYWNOŚĆ KORZENIA. Zgodnie z tą hipotezą bakterie rozwijające się w ryzosferze, jeszcze przed oddziaływaniem na symbiotycznego grzyba, mogą wpływać na modyfikację korzenia, ułatwiając tworzenie mikoryz. Duponnois [1992] wykazał udział hormonów

roślinnych wytwarzanych przez bakterie w przygotowaniu korzeni do nawiązania kontaktu z grzybem ektomikoryzowym. Kwas indoliloctowy (IAA) stymulował rozwój korzeni krótkich siewek, co mogło zwiększać prawdopodobieństwo kontaktu pomiędzy zarodnikami grzybowymi a tymi korzeniami.

Trzeba jednakże podkreślić, że niektóre grzyby ektomikoryzowe (np. *Laccaria laccata*) również syntetyzują IAA i fakt ten utrudnia ocenę realnego udziału auksyn bakteryjnych i grzybowych w tym zjawisku. Ponadto niektórzy badacze [Nylund 1988] sugerują, że rola IAA w tworzeniu ektomikoryz jest prawdopodobnie przeceniona, a wrażliwość korzenia na infekcję grzybową jest raczej głównie regulowana przez poziom azotu i fosforu zawartego w roślinie.

Duponnois [1992] wysuwa również hipotezę, że MHB mogą zmiękczać ścianę komórkową i blaszkę środkową pomiędzy komórkami miękiszu korowego przez wytwarzanie i działanie specyficznych enzymów, które ułatwiają penetrację grzybni. Spośród tych enzymów (endoglukanazy, celobiazazy, liazy pektynowe, ksylanazy), które wykrywano w płynach po hodowli MHB, największe znaczenie przypisuje się liazom pektynowym i ksylanazom.

Literatura

- Bowen G. D., Theodorou C. 1979. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 11: 941-943.
- Duponnois R., Garbaye J. 1990. Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Can. J. Bot.* 68: 2148-2152.
- Duponnois R., Garbaye J. 1991. Techniques for controlled synthesis of the Douglas-fir *Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annal. Des Sci. Forest.* 48: 611-650.
- Duponnois R. 1992. Les bactéries auxiliaires de la mycorrhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb. Franco) par *Laccaria laccata* souche S 238. these de L'Université de Nancy, France.
- Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., Berge O., Heulin T. 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir *Laccata bicolor* and Douglas fir. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1852-1860.
- Garbaye J., Bowen G. D. 1987. Effect of different microflora on the success of mycorrhizal inoculation of *Pinus sylvestris*. *Can. J. Forest Res.* 17: 941-943.
- Garbaye J., Bowen G. D. 1989. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhiza. *New Phytol.* 112: 383-388
- Garbaye J. 1991. Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia* 47: 370-375.
- Garbaye J. 1994. Transley Review No 76. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- Le Tacon F., Skinner F. A., Mosse B. 1983. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae* under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentration. *Can. J. Microbiol.* 29: 1280-1285.
- Li C. Y., Castellano M. A. 1984. Dinitrogen fixing bacteria isolated from three sporocarps. W: Molina R. [red.] 6th North American Conference on Mycorrhizae. Forestry Research Lab., Oregon State Univ., Corvallis, Oregon.
- Li C. Y., Massicote H. B., Moore L. V. H. 1992. Nitrogen fixation *Bacillus* sp. associated with Douglas fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil.* 110: 35-40.
- Linderman R. G. 1988. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopathol.* 78: 366-371.
- Marx D. H., Cordell C. E., Kenney D. S., Mexal J. G., Arthman J. D., Riffle J. W., Molina R. J. 1984. Commercial vegetative mycelium of *Pisolithus tinctorius* and inoculum techniques for development of ectomycorrhizal on bare root seedlings. *Forest Sci., Monograph.* 25.
- Nylund J.E. 1988. The regulation of ectomycorrhizas formation – carbohydrate and hormone theories revised. *J. Forest Res.*, 3: 363-370.
- Rózycki H., Dahm H., Strzelczyk E., Li Y. C. 1999. Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Appl. Soil Ecol.* 12: 239-250.
- Staatsma G., Van Griensven L. J., Bruinsma J. 1986. Root influence on in vitro growth of hyphae of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* replaced by carbon dioxide. *Physiol. Plant.* 67: 521-528.
- Strzelczyk E. 1998. Niektóre wzajemne oddziaływania biologiczne mogące zachodzić w mikoryzosferze. W: Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby. Materiały Zjazdowe, Katedra Mikrobiologii Rolnej, Akademia Rolnicza w Poznaniu. 31-41.

Timonen S., Jorgensen K. S., Haahtela K., Sen R. 1998. Bacterial community structure at defined locations of *Pinus sylvestris*-*Suillus bovinus* and *Pinus sylvestris*-*Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest humus and nursery peat. Can. J. Microbiol. 44: 499-513.

SUMMARY

Bacteria associated with mycorrhizae and their role in the functioning of symbiosis

Abundance of easily available organic compounds in the rhizosphere stimulates growth and development of microorganisms and such phenomenon is called "rhizosphere effect". Another significant biological aspect is colonization of the plant roots by symbiotic fungi, forming specialized structures, called mycorrhizae. Before mycorrhizal fungus has contact with sensitive roots, fungi grow in the free-living stage, influencing each other with rhizosphere bacteria and with different populations of fungi. Some of these organisms affect negatively and other positively the growth of mycorrhizal fungi.