

# EKOLOGIE MIKROORGANISMŮ

## 7

Rostliny a mikroorganismy

# Move Over, Bacteria! Viruses Make Their Mark as Mutualistic Microbial Symbionts

**Marilyn J. Roossinck**

Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, Department of Biology, and Center for Infectious Disease Dynamics, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

**Viruses are being redefined as more than just pathogens. They are also critical symbiotic partners in the health of their hosts. In some cases, viruses have fused with their hosts in symbiogenetic relationships. Mutualistic interactions are found in plant, insect, and mammalian viruses, as well as with eukaryotic and prokaryotic microbes, and some interactions involve multiple players of the holobiont. With increased virus discovery, more mutualistic interactions are being described and more will undoubtedly be discovered.**

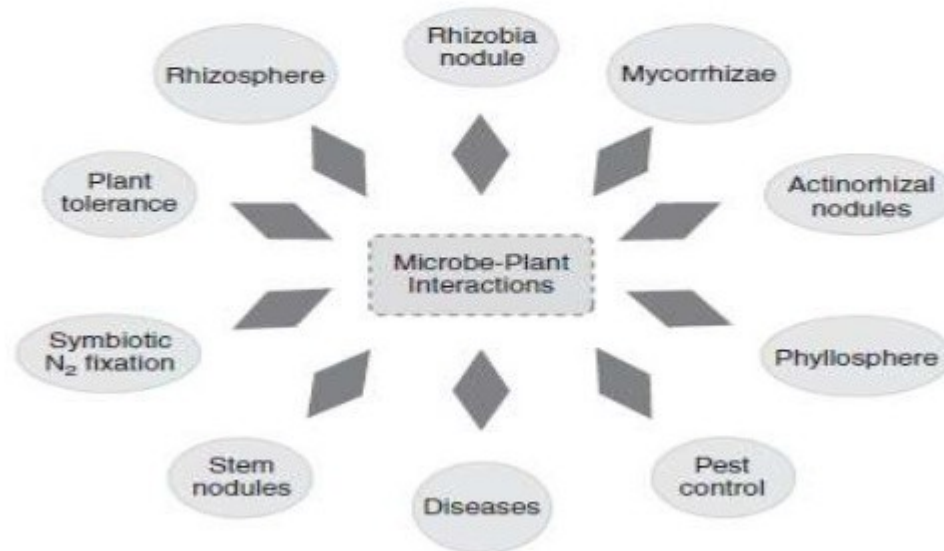
**W**hile viruses have long had a very bad name as pathogens, and there are certainly many devastating human, animal, and plant diseases attributed to viruses, viruses are not all bad (1). Recent studies highlight the amazing intricacy of virus-host interactions that have evolved over long periods of time and involve interactions between the hosts and other entities, including other

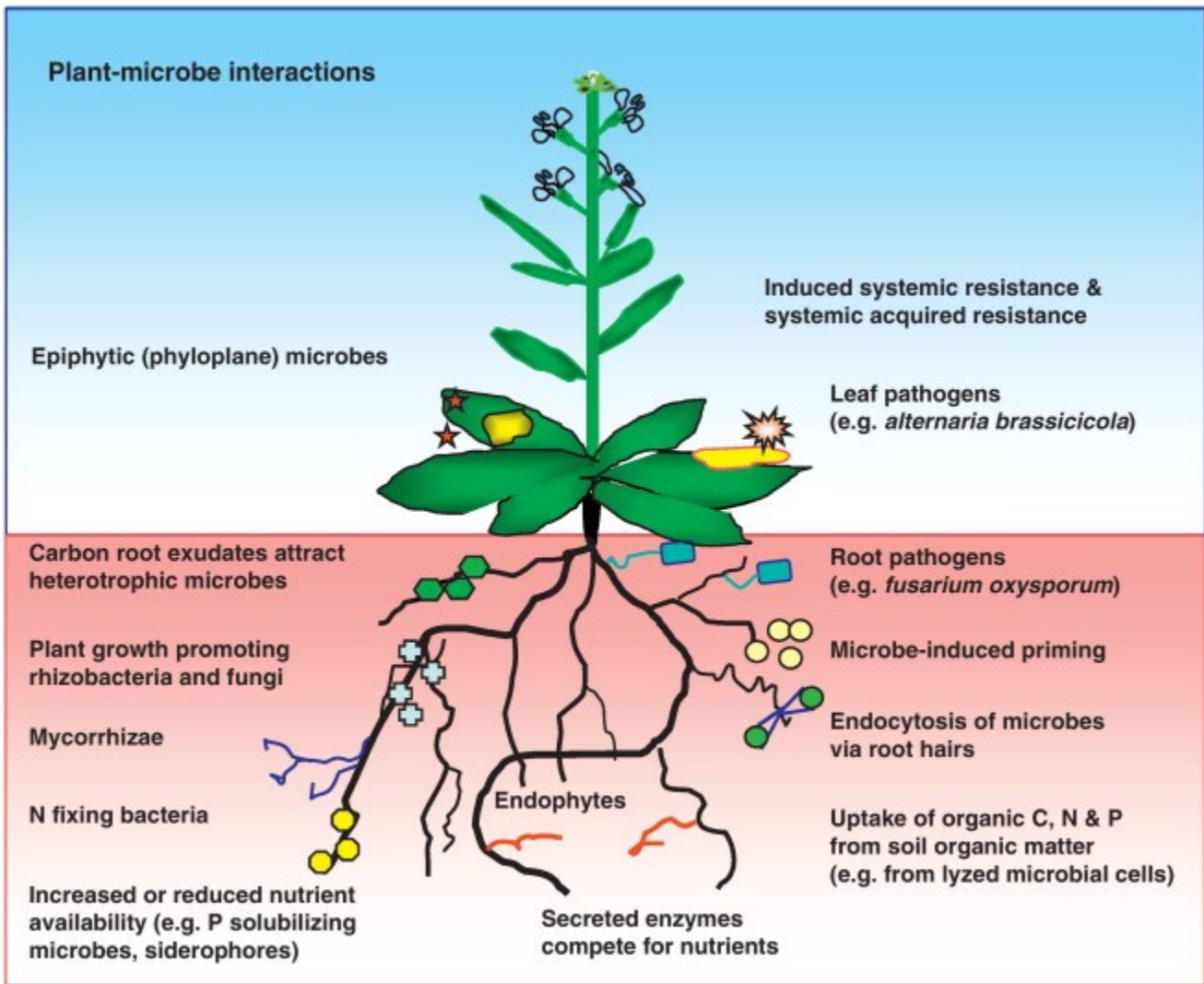
separate entities any longer, and this could be considered an example of mutualistic symbiosis in the process of becoming symbiogenetic.

In some cases, entire viruses genomes are integrated into the host genome, but these can exogenize and establish infections under some conditions. The badnavirus *Banana streak virus*, a para-

- interakce nejen mezi mikroby, ale i mezi mikroby a okolím – rostlinami
- rhizosféra je zóna převážně komensálních a mutualistických vztahů mezi mikroby a rostlinami
- eko- a endomykorhizní houby poskytují rostlinám minerální látky a vodu
- rostliny jim poskytují fotosyntetáty
- asociace mezi fixátory dusíku a rostlinami
- kolonizace nadzemních povrchů rostlin převážně komensálními mikroby
- negativní vztahy - virové, bakteriální a houbové choroby
  
- mutualismus – vysoce specializované interakce
- rostliny poskytují uhlíkaté látky bakteriím pro růst
- bakterie\houby zvyšují příjem minerálů
  
- komenzalismus – kořenové exudáty poskytují živiny bakteriím rostoucím na povrchu nebo v bezprostřední blízkosti - běžnější než mutualismus
  
- parazitismus

## Model indicating various plant–microbe interactions





TRENDS in Biotechnology

## Symbióza

- symbióza s mnoha organismy - lepší přežívání v asociaci s dalším partnerem
- rozsivky, obrněnky, mořské houby, lišejníky, mechy, Geosiphon, Gunnera, Azolla...



Rozsivka *Epithemia turgida* a endosymbiotické sinice v cytoplazmě.

## Symbióza se sinicemi *Nostoc* a *Anabaena*

- Jaterníky
- Mechy (Bryophyta)
- Kapradiny (Pteridophytes)



*Nostoc pruniforme* - kolonie

## Cykasy

- rod *Cycas* - „coralloid roots“ - vzniká ještě před invazí sinic
- jediné nahosemenné rostliny fixující dusík
- i cévnaté rostliny s kořenovými hlízkami, kde je prokaryotickým partnerem sinice

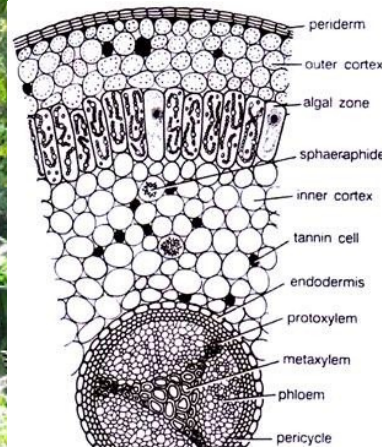
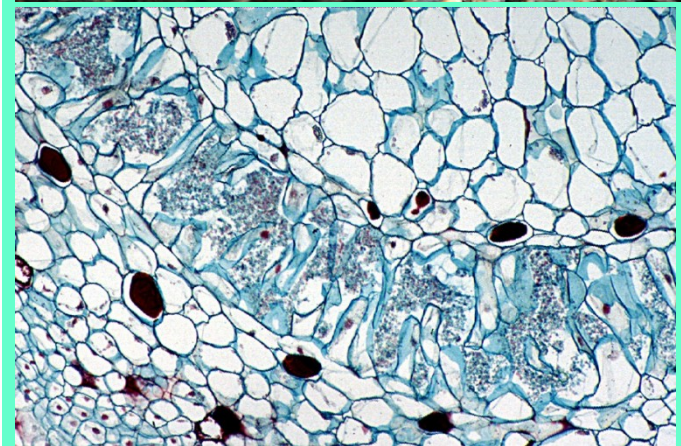


Fig. 8.18. *Cycas revoluta* T.S. coralloid root





## *Gunnera* – noduly (*Nostoc*) na stonku

- krytosemenná rostlina
- dusík fixující sinice v kapsách na bázi řapíku
- sinice vytváří filmy na listech i jiných tropických krytosemenných rostlinách
- J a stř. Americe, kde se nazývá „nalca“
- mladé řapíky se často loupou a jí



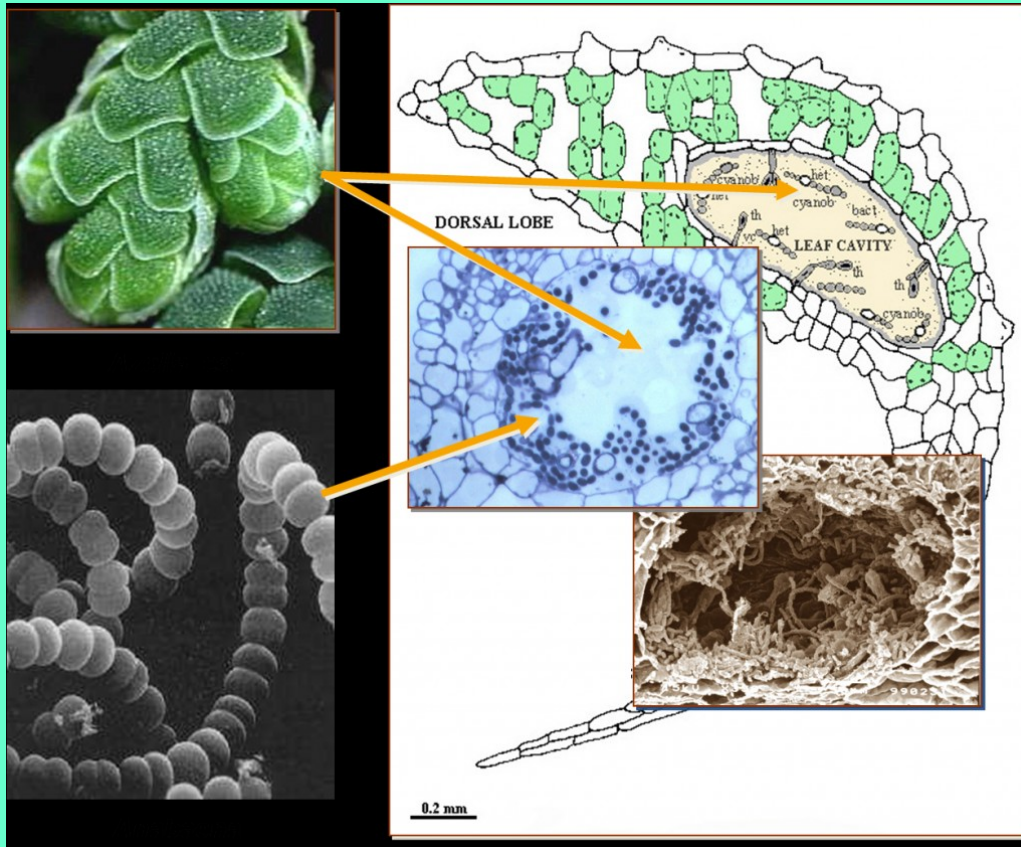
*Nostoc punctiforme*

<https://botanicalgarden.berkeley.edu/glad-you-asked/gunnera>



## Azolla a Anabaena

- kapradina *Azolla* - vody v tropech/subtropech
- spod. strana listů - dutiny obsahující sinice *Anabaena*
- ta produkuje neurotoxiny – ochrana rostliny před spásáním...?
- *Anabaena* může fixovat několik kg N za den, ročně 50-150 kg/ha – rýžová pole
- fixace není potlačena ani dusíkatým hnojením, není citlivá k pH a salinitě



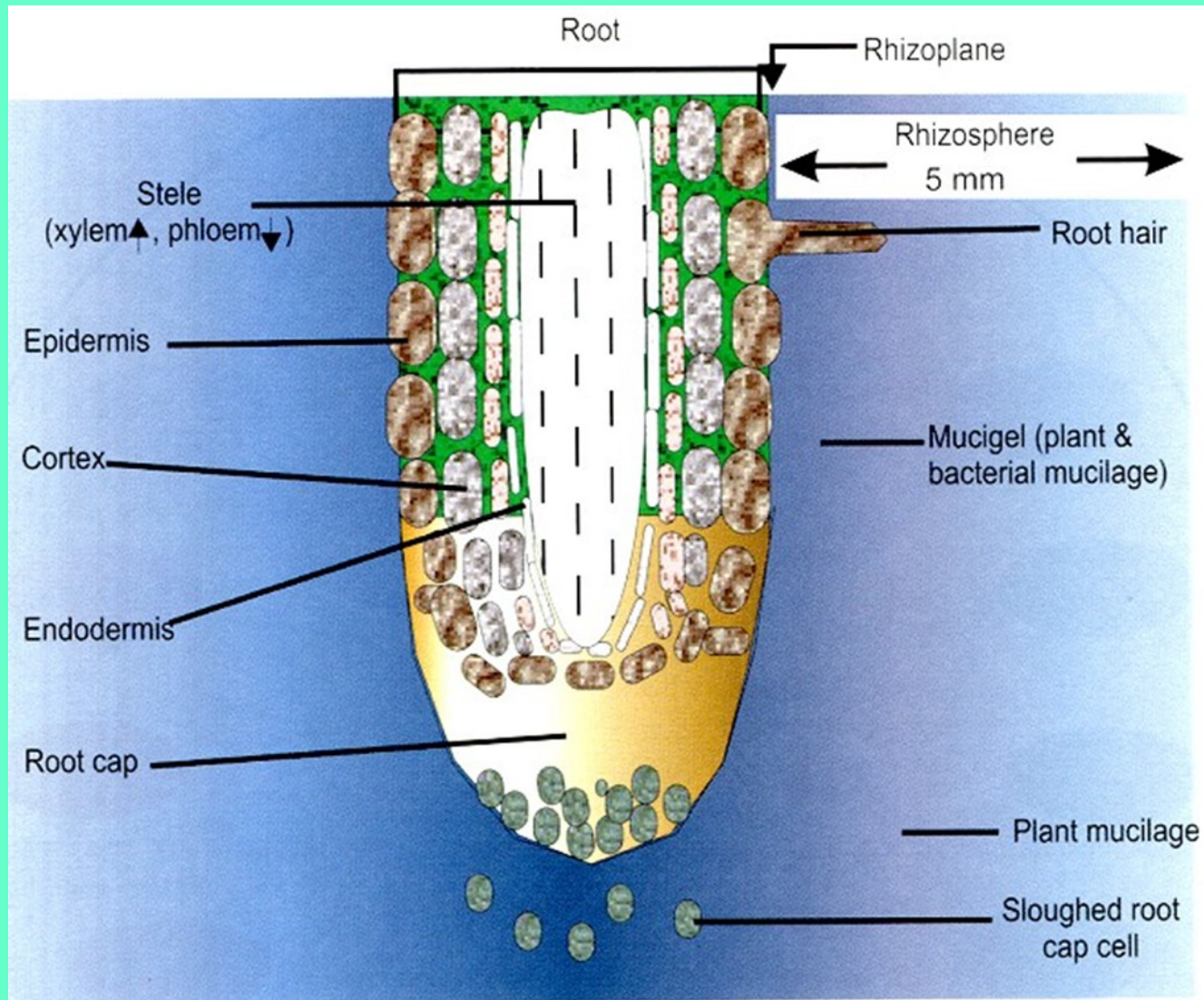
## Kořeny rostlin

- výborné prostředí pro růst mikroorganismů
- na kořenech a v okolí velké množství
- interakce mezi mikroby a kořeny uspokojuje nutriční požadavky obou partnerů
- rhizosféra - tenká vrstva půdy, která zůstane na kořenech po jejich otřepání
- velikost záleží na druhu rostliny (struktura kořenů)
- kořenové vlášení značně zvyšuje plochu kořenů v porovnání s kulovým kořenem

Př. jedna rostlina pšenice :

- přes 200 m kořenů
- průměrný průměr kořenů 0.1 mm
- povrch kořenů pak přes 6 m<sup>2</sup>
- jen 4-10% plochy kořenů (rhizoplanu) v přímém kontaktu s mikroby
- víc mikrobů je pak v celé rhizosféře





## rhizoplan

- plocha kořenů s tenkou vrstvičkou půdy

## rhizosheath

- modifikace rhizosféry – relativně tlustý cylindr půdy lpící na kořenech typický u pouštních trav
- zrnka písku spojené extracelulárním „mucigelem“ – konzervace vláhy
- zvýšená mikrobiální činnost, zvýšená fixace dusíku
- interakce v rhizosféře založené na hospodaření s vodou, uvolnění org. látek kořeny, mikrobiální produkce rostlinných růstových faktorů, minerálních živin

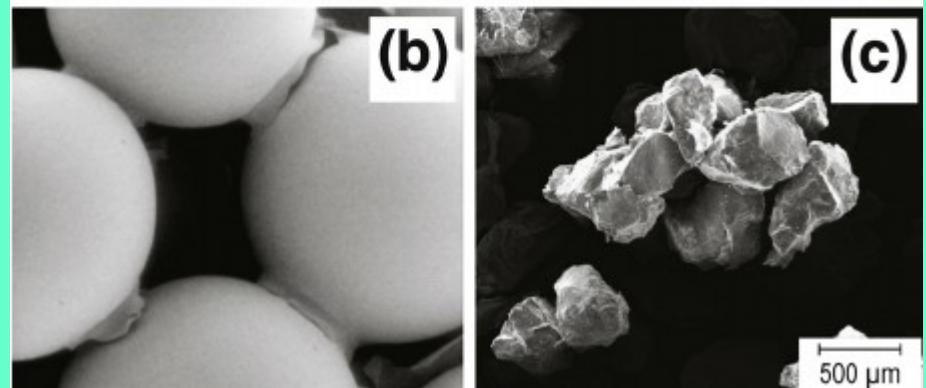
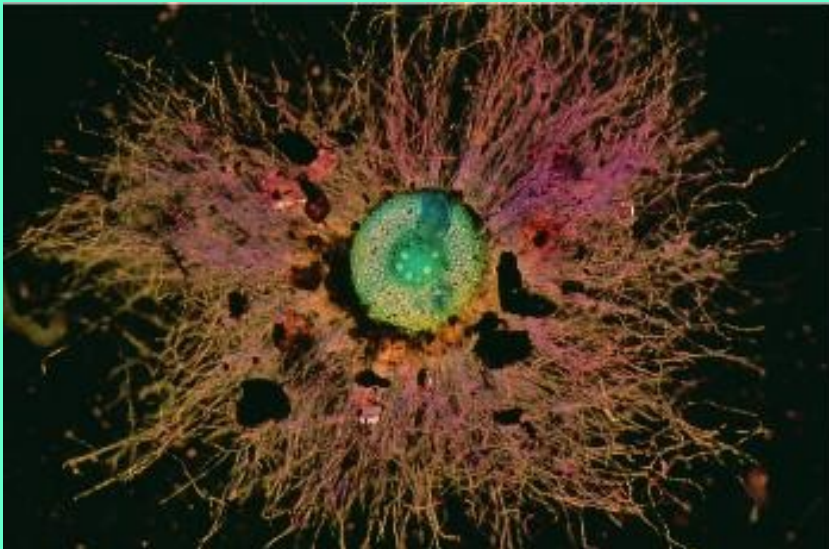
## mucigel

- slizovitá viskózní substance- hydratované polysacharidy
- lubrikuje kořenovou špičku při pronikání půdou
- půdní částice se tu přichytí – zlepšení příjmu vody a živin  
- podnícení růstu prospěšných hub a bakterií fixujících N

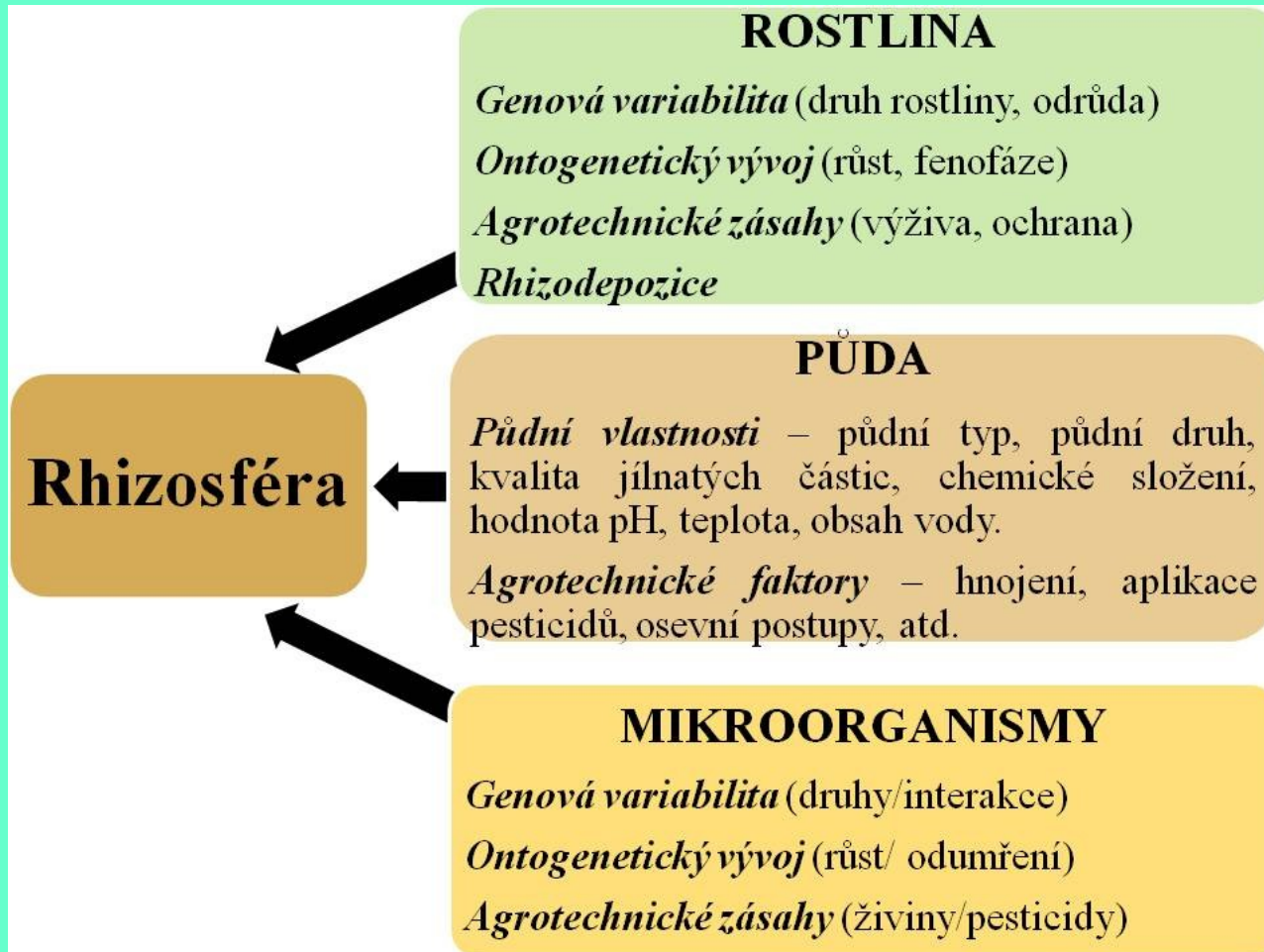


## rhizosferní efekt

- v rhizosféře až 100x víc mikrobů než ve volné půdě
- dle rostliny a jejího fyziologického stavu
- víc G- tyčinkovitých bakterií
- méně G+ tyček, koků a pleomorfních b. než ve volné půdě
- více pohyblivých bakterií jako *Pseudomonas*
- organismy s vyšší rychlostí růstu



Procesy v rhizosféře jsou determinovány vzájemným působením rostliny, půdy a půdních mikroorganismů. Jedná se o obrovský komplex vzájemně provázaných dílčích reakcí...





- kořeny obklopené mikroby uvolňují mnohokrát víc látek než sterilní kořeny
- některé inhibují, ale většina stimuluje růst mikrobů
- mikroorganismy v rhizosféře mají jiné požadavky na výživu než mikrobi z volné půdy
- mnohé vyžadují AK k růstu – pravděpodobně z kořenových exudátů
- sukcese na kořenech dle růstových fází rostliny
- během vývoje rostliny se výrazná rhizosferní sukcese odrazí ve vývoji mikrobiální populace rychle rostoucích mikrobů vyžadujících růstové faktory

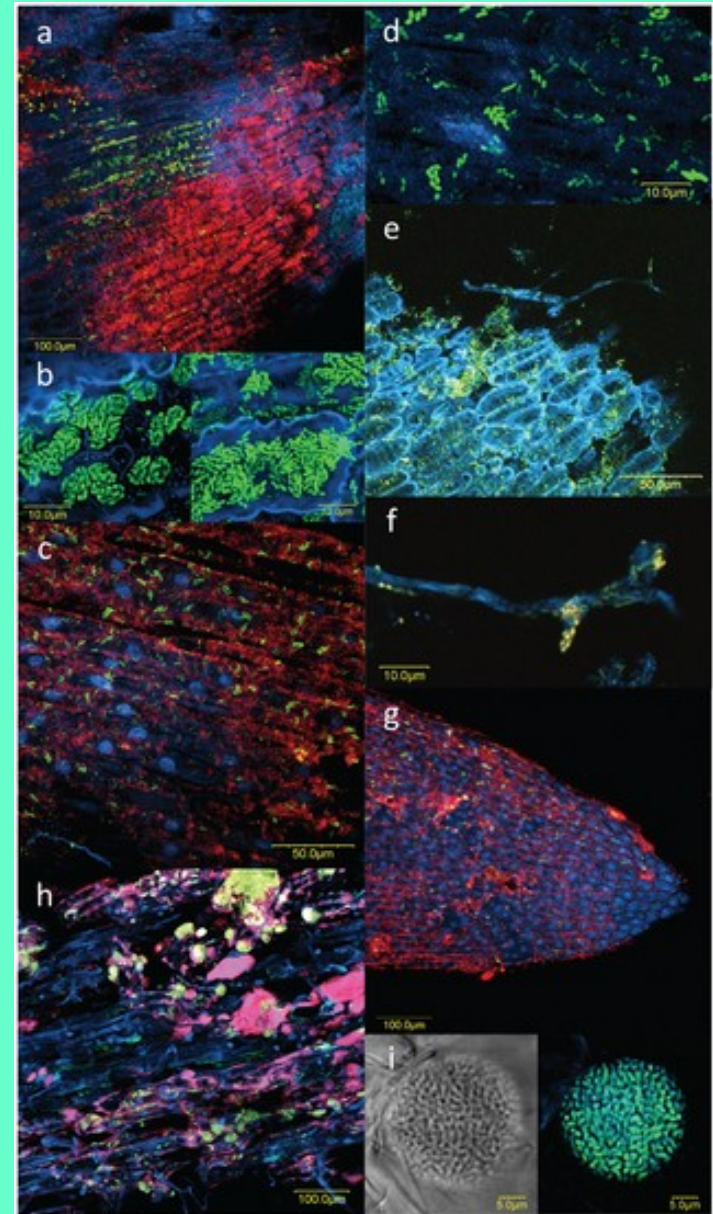
#### Kořenové exudáty

- AK
- ketokyseliny
- vitamíny
- cukry
- taniny
- alkaloidy
- fosfatidy



## Sukcese mikrobiálních společenstev na kořenech

- odráží to změny ve složení látek uvolňovaných kořeny
- nejprve karbohydráty a slizovité látky podporující růst velké bakteriální populace ve žlábcích epidermálních buněk na povrchu kořenů a slizové vrstvě
- s dozráváním kořenů dochází k lyzi části kořenového materiálu a uvolňují se jednoduché cukry a AK
- *Pseudomonas* a další rychle rostoucí bakterie
- stárnutí rostliny – úbytek bakterií
- 4-týdenní rostliny kukuřice – 7% fotosyntetátů uvolněno v kořenových exudátech (z celk. 25% fotosyntetátů doručených do kořenů)



## Fixace N<sub>2</sub> v rhizosféře

- v rhizosféře tropických trav *Digitaria* (listy plazící se po zemi), *Panicum* (spíš vysoké travy) a *Paspalum* se pravidelně nachází mikroaerofilní *Azospirillum* i aerobní *Azotobacter paspali*
- v polních pokusech až 40 kg N/ha
- *Azospirillum* i v mírném pásmu (trávy, kukuřice) – fixace zanedbatelná
- vedlejší produkt může být i vodík
- některé rody *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* mají hydrogenázu, která vodík využije
- někdy zde *Acinetobacter* využ. H<sub>2</sub>
- mělké mořské pobřeží – trávy *Zostera marina* (vocha mořská) v mírném pásmu, *Thalassia testudinum* (želví tráva) v tropech



## *Spartina alterniflora*

- invazní rostliny - tichomořské pobřeží USA, zde se rozšířila slanomilná travina *Spartina alterniflora* dovezená z Evropy v 19. století
- fixace N<sub>2</sub> ve slaniskách s trávou - zřejmě směs bakterií a sinic – epifytně na mrtvých stoncích trávy
- ze záplavového ekosystému učinila hustě porostlou slanou bažinu
- zmizelo mnoho míst, kde hledali potravu migrující ptáci
- některé vodní toky se zcela zanesly sedimenty, kterým hustý porost brání v odplavování



## Efekt rhizosféry populace na rostliny

- zesílený růst rostlin
- zvýšená recyklace a rozpouštění minerálních látek
- syntéza vitamínů, AK, auxinů, cytokininů, giberelinů
- antagonismus k patogenům - založený na kompetici a vývoji amensálních vztahů – produkce antibiotik

## Záplavové půdy

- v anaerobních podmínkách nedostatek O<sub>2</sub>, přebytek H<sub>2</sub>S
- rýže (a možná i další) je chráněna mutualistickou asociací s *Beggiatoa* (gamma Proteobacteria)
- ta využívá kyslík a enzym katalázu z kořenů rýže
- na oplátku oxiduje sirovodík na síru nebo sulfát
- tím chrání cytochromových systémů v kořenech
- látky produkované mikroby podporují bujný růst kořenů
- auxiny a gibereliny zvyšují rychlost klíčení a rozvoj kořenového vlášení
- *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* (IAA)
- rhizosféra pšenice – produkce IAA (indolová kyselina) zvyšuje růst kořenů



## Alelopatické (antagonistické) látky

- uvolňované mikroby v rhizosféře jedné rostliny mohou bránit růstu rostliny jiné
- rhizosferní mikroflóra mladé pšenice brání růstu hrachu a salátu
- při dozrávání ústup této mikroflóry
- a náhrada mikroflórou produkující růst podporující látky podobné giberelinům

## Mikroflóra zlepšuje příjem

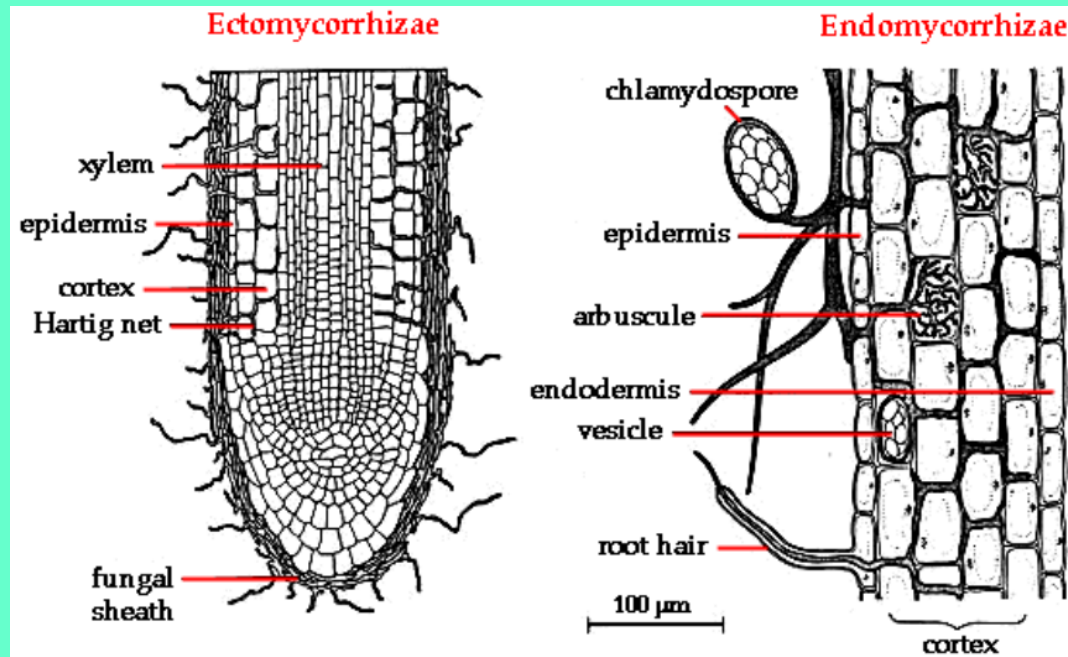
- fosfátů – mikrobiální kyseliny rozpustí apatit
- železo a mangan – chelatační mikrobiální látky
- vápník – díky zvýšenému obsahu CO<sub>2</sub> – zvýší rozpustnost Ca
- transport těžkých kovů

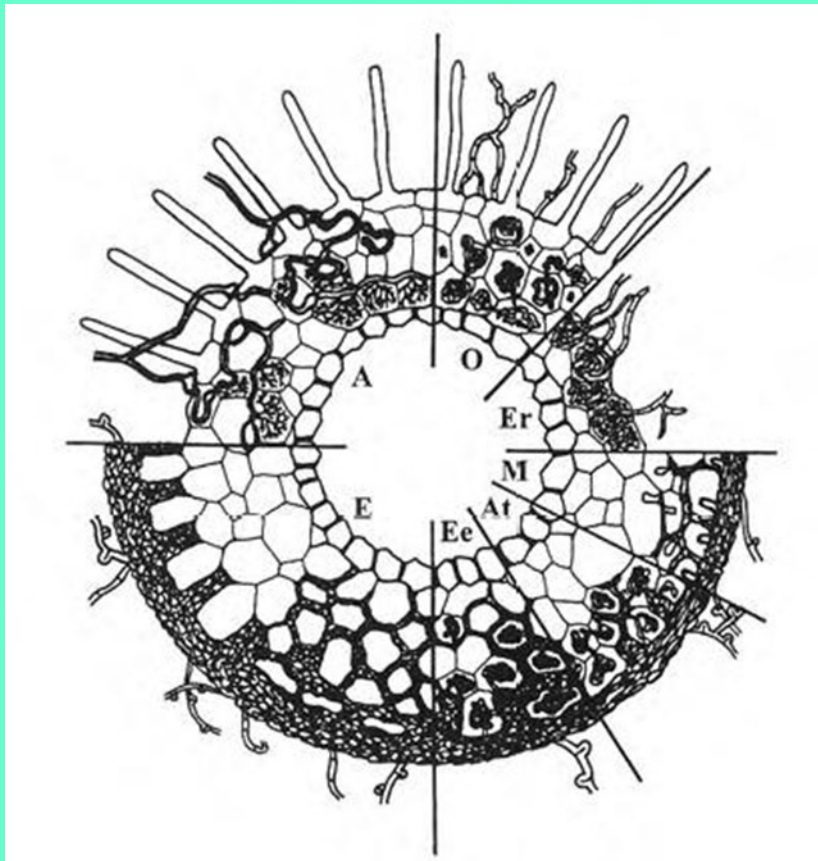
## Někdy ale naopak poutání minerálů

- bakteriální imobilizace zinku (nemoc „malých listů“ ovocných stromů)
- oxidace manganu – šedé skvrny dubu
- imobilizace N (do biomasy, ale i ztráty – denitrifikací)

# Mykorhiza

- symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin – mutualismus (až parazitismus)
- až 90% rostlin, tráva – až 100m mycelia/1 g půdy
- pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry (**endomycorhiza**)
- vlákna jen v mezibuněčném prostoru (**ektomycorhiza**)
- mycelium nezasahuje do středního válce kořenu rostliny
- jde o specifický vztah – specializace
- zvýšený příjem vody a živin, především P a N
- houby stimulují rhizosférní mikrofloru a její enzymatické aktivity
- významné pro výživu, růst a zdravotní stav rostlin





## Typy mykorhiz schematicky znázorněné v příčném řezu kořenem

(E) - ektomykorhiza (kořen je obalen hustým hyfovým pláštěm, hyfy nevstupují do buněk, ale prorůstají mezibuněčnými prostory a tvoří tak Hartigovu síť)

(A) - arbuskulární mykorhiza (v buňkách jsou keříčkovité arbuskuly, mezi buňkami váčkovité vezikuly)

(O) - orchideoidní mykorrhiza (hyfy tvoří charakteristické smotky v primární kůře, v některých buňkách jsou již tyto smotky odumřelé a zvolna se ztrácejí)

(Er) - erikoidní mykorrhiza (hyfy tvoří také smotky, ale převážně v krycích vrstvách kořene)

(M), (At), (Ee) - přechodné typy mezi endo- a ektomykorhizami:  
 (M) - monotropoidní mykorrhiza  
 (At) - arbutoidní mykorrhiza  
 (Ee) – ektendomykorhiza

Všimněte si chybějících kořenových vlásků u ektomykorhizy, erikoidní a všech přechodných (Ee, At, M) mykorhiz.



## Ektomykorhiza

- zevní pseudoparenchymatická pochva víc než 40 $\mu$ m silná
- 40% suché hmoty kořenů
- hyfy v mezibuněčných prostorech epidermis a kortexu, ale nikdy v buňce!
- změněná morfologie kořenů– kratší a dichotomické větvení



Kořenové špičky muchomůrky (*Amanita*) v mykorhizním svazku

## Ektomykorhiza

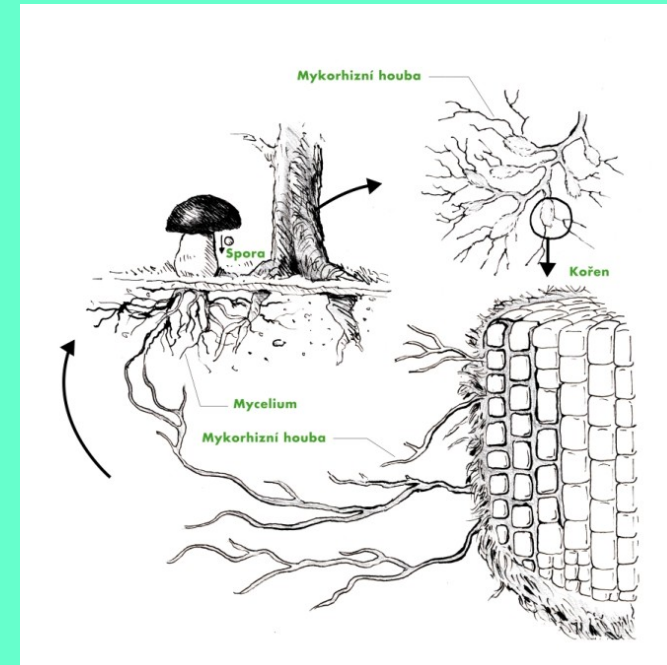
- nachází se u nahosemenných i krytosemenných (kvetoucích) rostlin
- většina stromů mírného pásma má ektomykorhizu
- ascomycetes a basidiomycetes – acidofilní pH 4-6 (3)
- houby někdy vyžadují vitamíny
- naopak uvolňují auxiny, gibereliny, cytokininy, vitamíny, antibiotika, mastné kyseliny
- někdy i enzymy – celulózy – ty ale v symbióze potlačeny

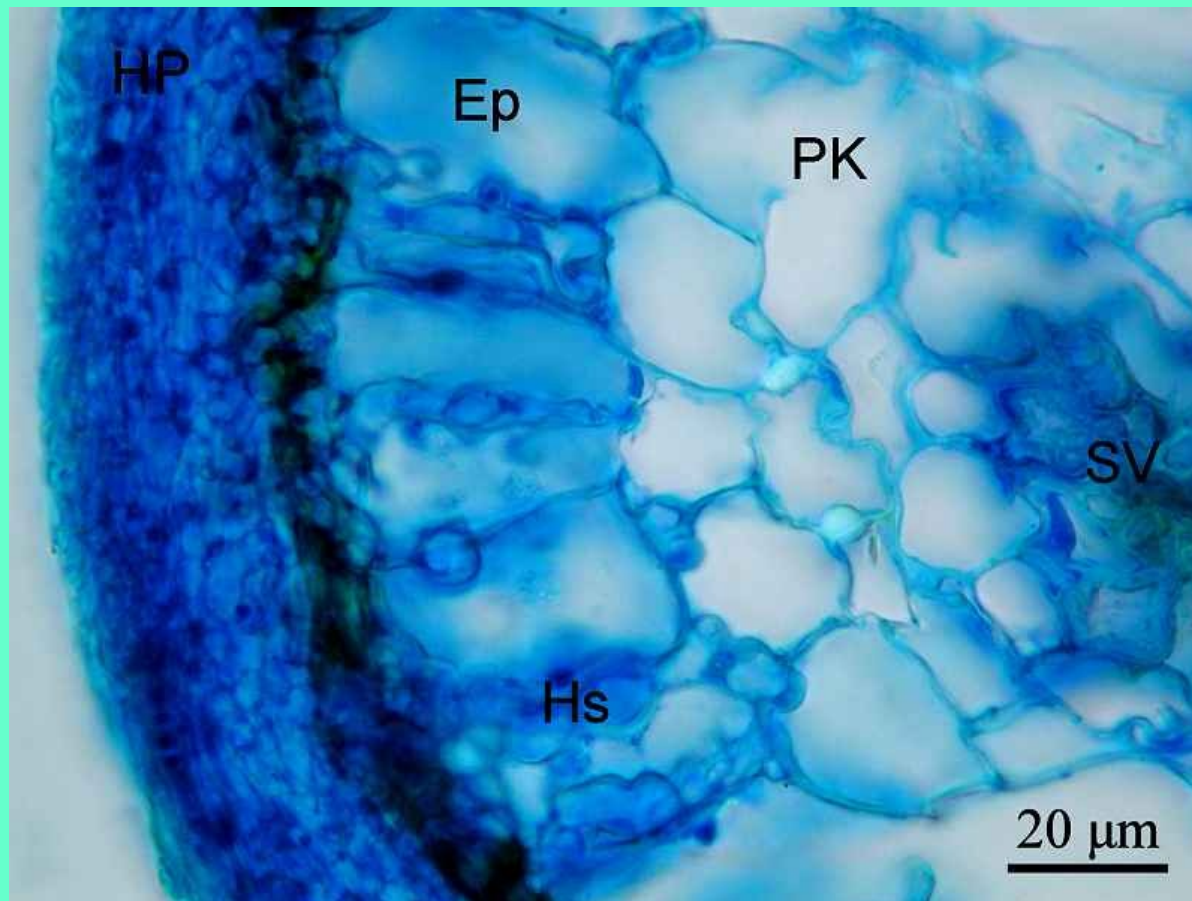
## Přínos pro rostlinu

- prodloužený růst a životnost kořenů
- lepší příjem živin z půdy – větší plocha kořenů
- rezistence k patogenům (fyzická bariéra + antibiotika)
- zvýšená tolerance k teplotě, suchu, pH

## Houba – fotosyntetáty (unikne konkurenci o živiny)

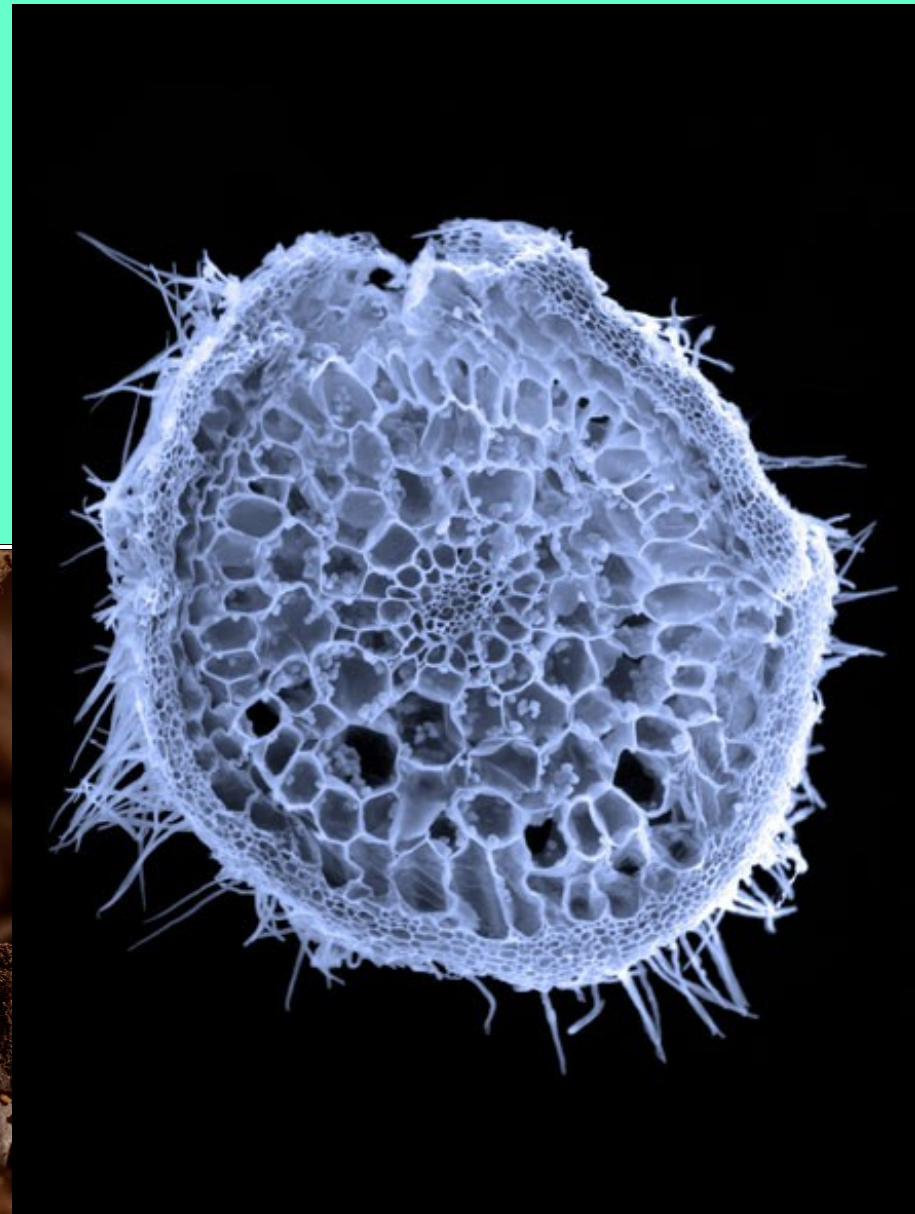
- bez rostliny často netvoří plodnice (i když roste)
- dichotomické větvení a prodloužený růst kořínků
- tvorba vlasových kořínků potlačena - nahrazeny hyfami
- zvýšený příjem P a K (primární hromadění v mycéliu)
- někdy kořeny uvolňují těkavé org. kyseliny s fungistatickým účinkem
- rovnováha s mycorrh. houbou i ochrana proti houbovým patogenům





Příčný řez ektomykorhizním kořenem jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*), s paraepidermálním typem Hartigovy sítě. Povrch kořene je kryt silnou vrstvou hyf houbového pláště (HP). Z něj vrůstají hyfy do mezibuněčných prostor jednovrstevné kořenové epidermis (=rhizodermis, Ep) a vytváří paraepidermální typ Hartigovy sítě (Hs). Další vrstvy primární kůry (PK) jsou již prosty kolonizace, stejně tak jako celý střední válec (SV).

Příčný řez ektomykorhizním kořenem vrby, na jehož obvodu je zvláště patrný několikavrstevný hyfový plášť tvořený symbiotickou houbou





© Jaroslav Malý

[www.naturfoto.cz](http://www.naturfoto.cz)

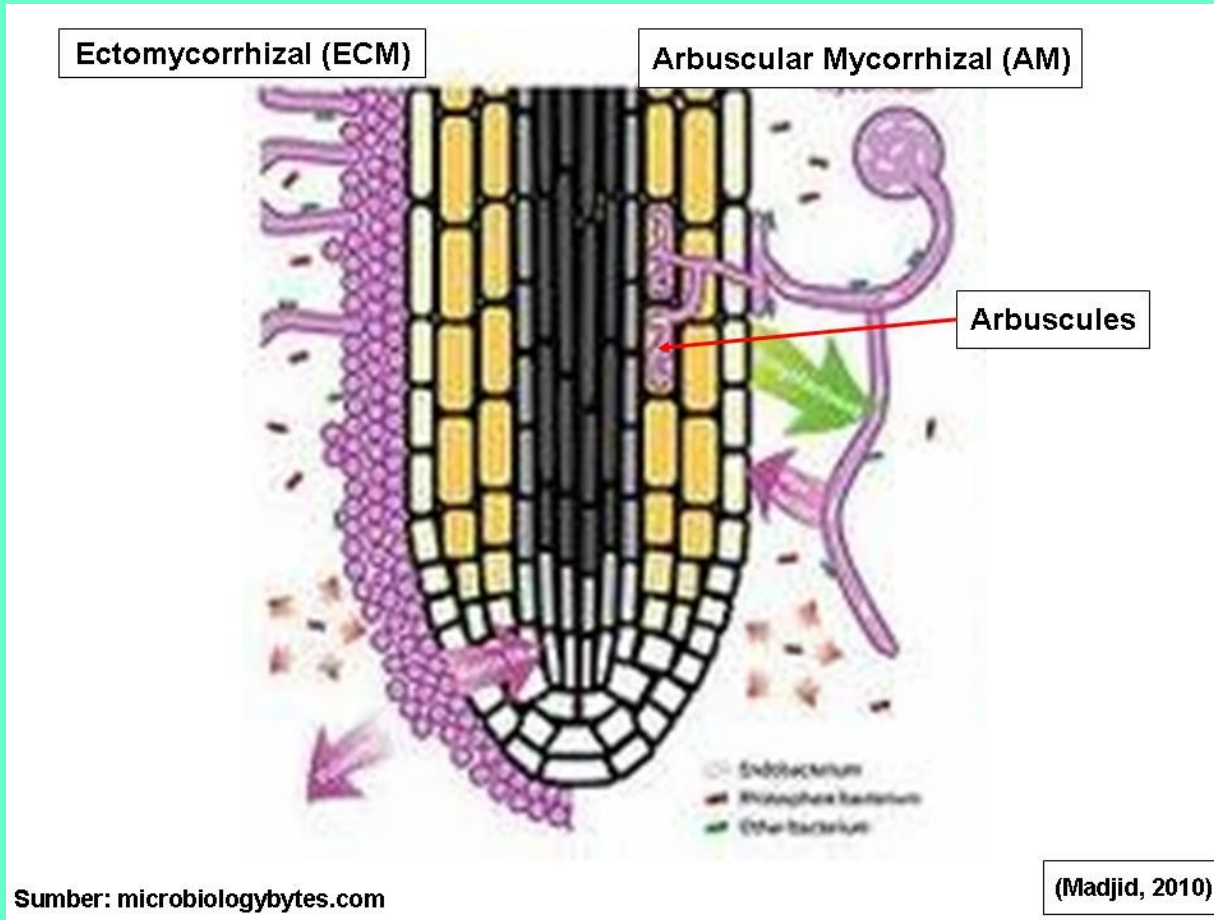


© Jaroslav Malý

[www.naturfoto.cz](http://www.naturfoto.cz)

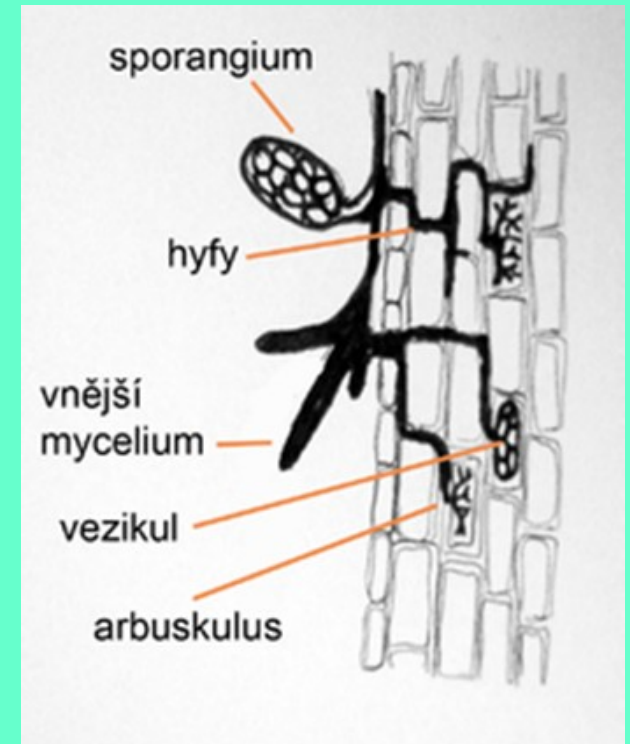
# Endomykorhiza

- hyfy vnikají do buněk
- unikátní postavení v symbióze - buňky jsou vně i uvnitř hostitele
- nevytváří se pochva kolem kořenů



## VAM vesikulo- arbuskulární mykorhiza

- přítomnost arbuskulárních mycelií hub v půdě či v kořenech rostlin není - na rozdíl od hub ektomykorhizních - rozpoznatelná pouhým okem (mikroskop)
- arbuskulární mykorhizní houby vstupují do kortikálních buněk kořenů hostitelské rostliny a vytvářejí zde typické útvary – arbuskuly a vesikuly
- krátkověké arbuskuly, jsou místem intenzivní výměny živin mezi hostitelskou rostlinou a houbovým symbiontem
- vesikuly, kulovité nebo oválné ztlustliny hyf, plní zásobní funkci



## VAM

- až 240 tis druhů rostlin může mít mykorhizu s 6tis druhy hub
- tři čeledi: *Glomaceae*, *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*
- tyto houby se objevily zhruba před 383-462 milióny let a asi pomohly rostlinám kolonizovat zemi
- VAM typ nezmění strukturu kořenu, proto hůře detekovatelný
- častý u pšenice, kukuřice, brambor, bobu, sóje, rajčat, jahod, jablek, pomerančů, hroznů, bavlny, tabáku, čaje, kávy, kakaa, cukrové třtiny, javoru, gumovníku, a různých bylin
- kvetoucí rostliny, konifery, mechy, kapradiny a většině důležitých zem. plodin
- VAM houby se nepodařilo pěstovat v čisté kultuře

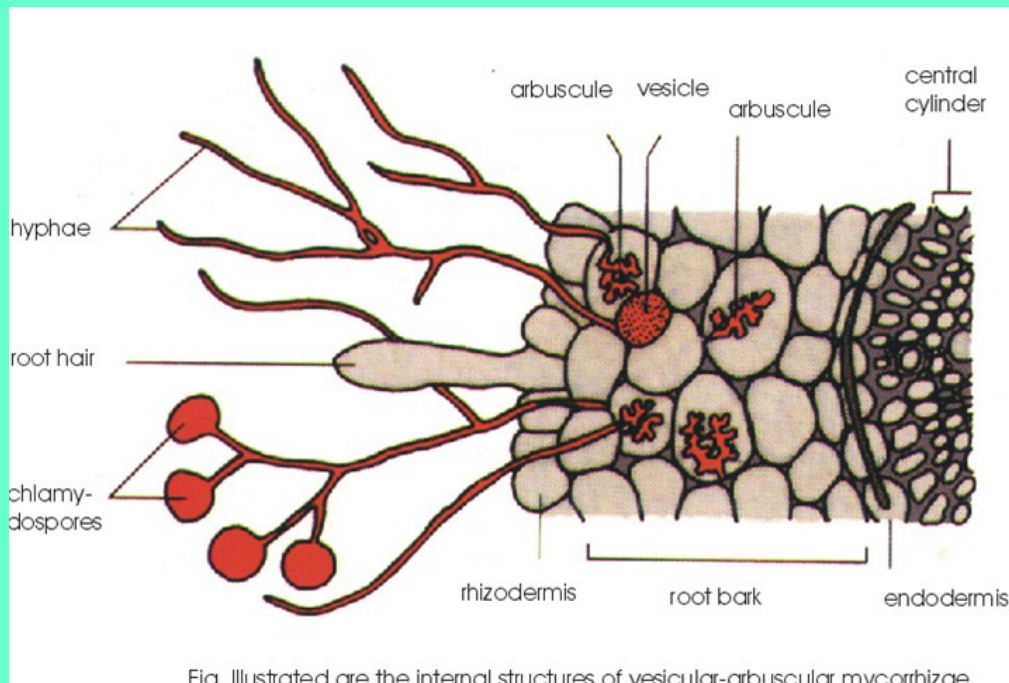
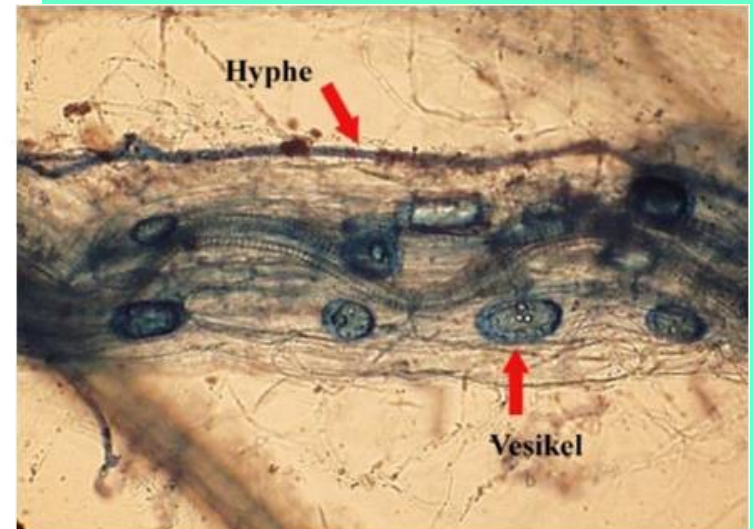
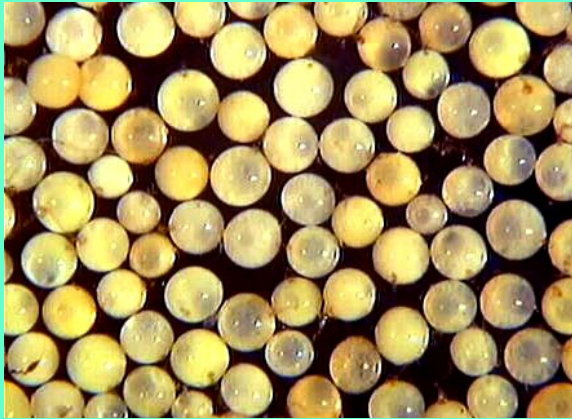


Fig. Illustrated are the internal structures of vesicular-arbuscular mycorrhizae

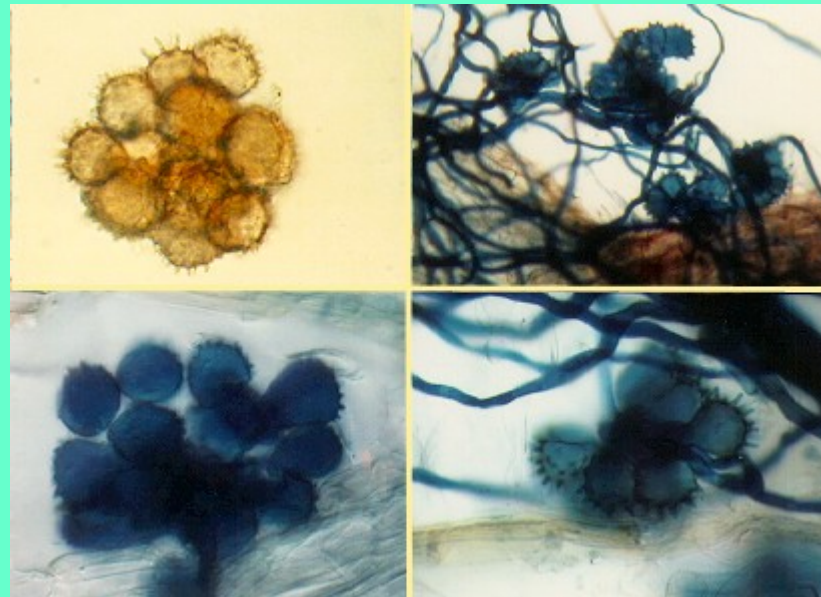




- *Gigaspora margarita* - až 250 tis bakt. endosymbiontů v jedné houbové spoře – identifikovány PCR jako *Burkholderia* (prekurzor eukaryotických mitochondrií?) – *nif* gen – fixace N?
- největší známé houbové spory – 20-400  $\mu\text{m}$
- mycelium odolnější stresům než kořeny (sucho, kovy, pH)
- zvýšený růst rostlin - zvýšený příjem P, Zn, sulfátů, amonného iontu



***Gigaspora margarita***



## VAM

- důležité zvláště v tropických půdách deficitních na P – problémy po vykáčení tropických pralesů
- bujnost tropických pralesů založena na mykorhize
- téměř humus, opad a téměř žádné minerální soli – vše vymyté tropickými dešti
- po vyklučení pralesa jedna nebo maximálně pár úrod a pak vše vyplaveno a bez hnojiv nic neporoste – opuštění půdy, eroze
- klučení může fungovat jen v malém měřítku (nízká hustota populace), kdy prales po 2-3 plodinách opět zaroste malé políčka (na desítky let)



- endomykorhiza mnohem méně nápadná než ektomykorhiza
- endomykorhiza – na stále rostoucích i dočasně rostoucích kořenech
- hyfy endomykorrhizy pronikají stěnu buněk kortexu- vesicle a arbuscule



- ektomykorhiza – jen na dočasně rostoucích bočních krátkých kořenech
- ale ani jedna mykorhiza neproniká cytoplasmatickou
- ektomykorhiza - dub, borovice, eukalyptus, bříza, dipterocarpus či oliva
- jen pár stromů v mírných oblastech jsou jen endomykorhizní (douglaska, osika, liliovník tulipánovitý, javor cukrový)
- několik těchto druhů (douglaska, osika) mohou vytvářet oba typy



## Erikoidní endomykorhiza

- hyfy pronikají do buněk rostliny, nejde o typ vesicular-arbuscular
- najdeme u pár řádů rostlin, například vřesovcotvaré (borůvka, drchnička, rododendrony) — rašeliniště, vřesoviště
- houba kolonizuje buňky rhizodermis
- v buňkách klubka a smyčky – výměna látek
- houba nefixuje N<sub>2</sub>, ale rostlina má lepší přístup k N, P a ostatním minerálům – významné v půdách s nízkým obsahem minerálních látek a nízkým pH
- houba čerpá živiny z odumřelých houbových hyf i živočichů (chitinázy, proteázy)



Kultura erikoidní houby izolovaná z rostliny *Woollyia pungens*

## Orchideoidní mykorrhiza

- téměř všechny orchideje - je to obligátní
- zcela mykotrofní jsou nezelené heterotrofní orchideje
- např. *Neottia nidus-avis* (hlísník) a klíčící stádia všech druhů orchidejí – semena malá s málo živinami
- často *Armillaria mellea*, *Rhizoctonia solani*
- houba proniká do buněk vnějšího kortexu, později zaniká (využita rostlinou) – vytváří zde klubíčka hyf
- ale houby mohou být i parazité hostitelů a naopak hostitel může strávit houbu – kolaps klubíček
- přesně vyvážený vzájemný parasitismus



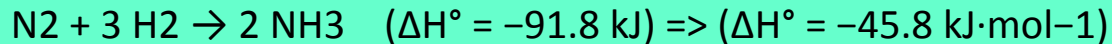
## Orchidejové louky Bílé Karpaty



# Fixace dusíku

## Průmyslová fixace dusíku

- v průběhu 19. století se postupně zvyšovala poptávka po dusičnanech a amoniaku - hnojivo a výbušniny
- zjevným zdrojem byl atmosférický dusík (N<sub>2</sub>), který tvoří téměř 80 % vzduchu
- vzdušný N<sub>2</sub> je velmi stabilní a nereaguje přímo s jinými chemikáliemi
- Haber-Boschův proces - umělý proces fixace dusíku-v současnosti hlavním postupem pro průmyslovou výrobu amoniaku
- proces přeměňuje atmosférický dusík (N<sub>2</sub>) na amoniak (NH<sub>3</sub>) reakcí s vodíkem (H<sub>2</sub>) za vysokého tlaku a teploty a za přítomnosti kovového katalyzátoru



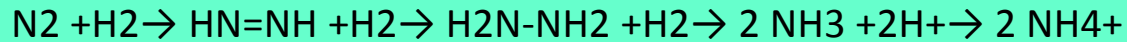
- množství dusíku z průmyslové fixace je podobné biologické fixaci, cca 100 mil tun N hnojiv/rok

## Biologická fixace dusíku

- diazotrofie
- je schopnost prokaryot redukovat trojnou vazbu v molekule atm. dusíku a začlenit jej do organické sloučeniny (amoniaku)
- proces - pomocí enzymu nitrogenázy a za dodání energie (ATP)
- diazotrofové - klíčové v koloběhu dusíku v přírodě, protože umožňují fixaci atmosférického N do organiky
- tzv. hlízkové bakterie, protože žijí v specializovaných orgánech-hlízkách
- mnoho dusík fixujících bakterií však nemá tendence asociovat se s kořeny vyšších rostlin (žijí volně)
- velké množství energie nutné k fixačním reakcím- největší význam autotrofové (zejména sinice)
- heterotrofní bakterie většinou vstupují do relativně úzké symbiózy s rostlinou, která jim energii dodává



- reakce se odehrává v několika krocích:



- amoniak je kvůli své jedovatosti (při vyšších koncentracích) ihned zabudováván do neškodných aminokyselin (např. glutaminu) a v této formě dále rozváděn po těle
- obrovské množství energie - 16 molekul ATP, nutné k redukci jediné molekuly  $\text{N}_2$
- údajně až 20% veškeré energie produkované při fotosyntéze v hostitelské rostlině se spotřebovává v hlízkách k hlízkové fixaci
- s každým fixovaným  $\text{N}_2$  je také vytvořen  $\text{H}_2$  a může být redukován substrát jako acetylen na etylén (detekce fixace N)
- jen některé kmeny rhizobií a bradyrhizobií mají hydrogenázu a mohou využít vytvořený vodík (jinak uvolňován jako odpad)

## Typy diazotrofů

- diazotrofové - v mnoha bakteriálních taxonomických skupinách, ale pár i v *Archaea*
- i u druhů, které fixují N<sub>2</sub>, mohou být kmeny nefixující (Postgate, 1998)
- fixace je zastavena, pokud je k dispozici jiný zdroj N i za přítomnosti většího množství kyslíku
- různé mechanismy ochrany před kyslíkem

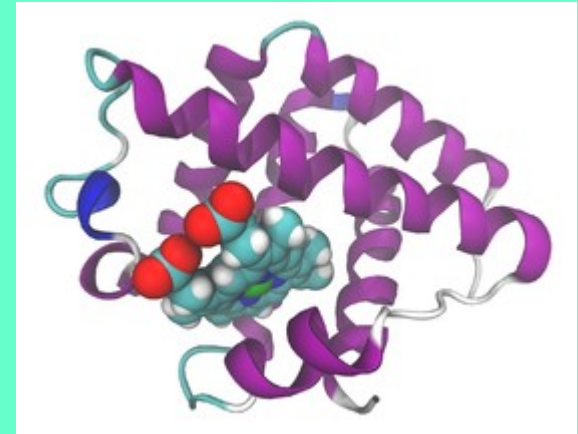


Diazotrofní organismy se dají obecně rozčlenit do několika skupin:

- žijící volně v půdě - rody *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azotococcus*, *Beijerinckia*
- žijící v asociaci s kořeny rostlin - aerobní (nebo mikroaerofilní) spirily - například rod *Azospirillum*
- žijící v symbióze s kořeny bobovitých rostlin - rody *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, souhrnně hlízkové bakterie
- dále jsou fixace vzdušného dusíku schopné některé sinice (*Nostoc*, *Anabaena*) a aktinomycety (*Frankia*), některé bakterie oxidující síru a enterobakterie (*Escherichia*)

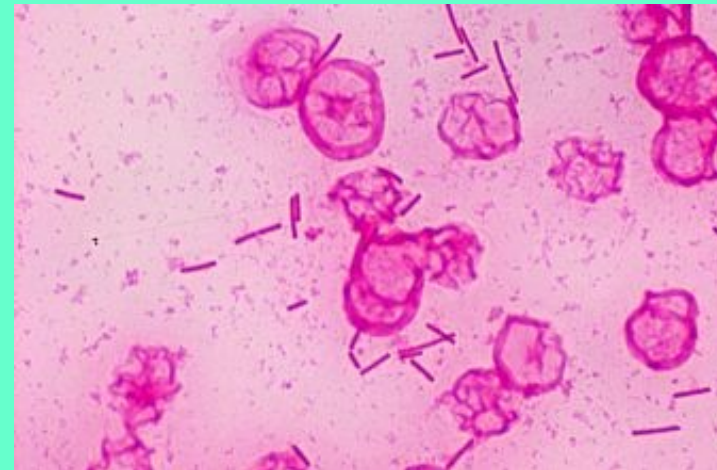
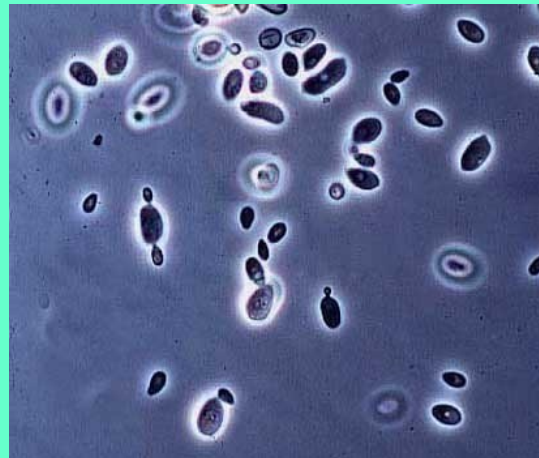
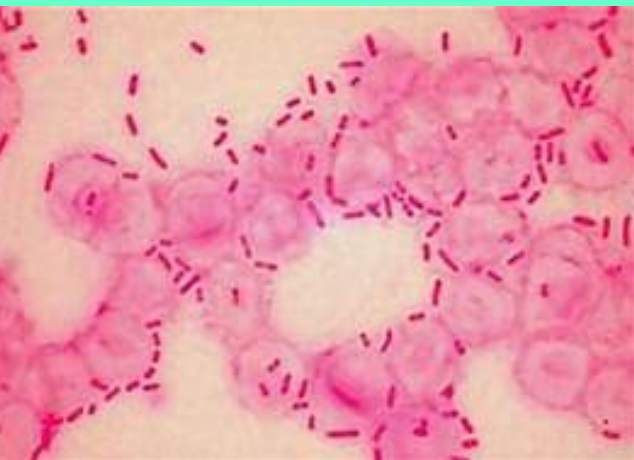
## Mechanismy ochrany proti kyslíku

- exprese enzymů jen v anaerobních podmínkách
- exprese enzymů v oddělených tkáních od fotosyntetických (některé sinice)
- časové oddělení fotosyntézy a fixace dusíku den – noc – u některých sinic
- využití proteinů odstraňujících kyslík – leghemoglobin - jenž je nezbytný při plnění funkce enzymu nitrogenázy

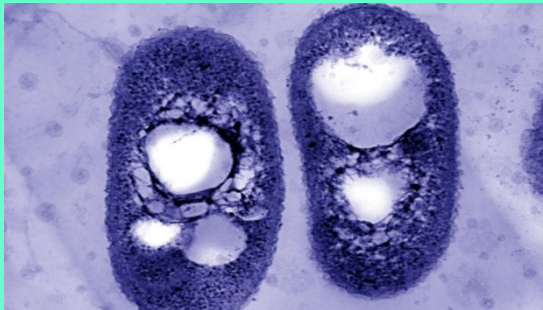


## Volně žijící diazotrofové

- méně prozkoumané, často obligátní anaerobové netolerující kyslík i když nefixují N<sub>2</sub>
- půdy, rozkládající se organická hmota (*Clostridium*)
- SRB– důležité v mořských sedimentech (e.g. *Desulfovibrio*)
- některé methanogenní Archea – fixace dusíku v bahně a zažívacím traktu zvířat
- často rychlost respirace kyslíku odpovídá rychlosti jeho doplňování – výsledkem je nízká koncentrace volného kyslíku
- *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa*, *B. macerans* a *Escherichia intermedia*

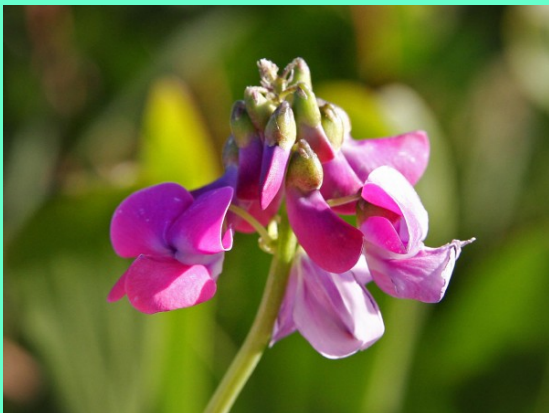


- aerobové – vyžadují kyslík k růstu ale jejich nitrogenáza je stále ke kyslíku citlivá
- *Azotobacter vinelandii* – vysoká rychlost respirace a ochranné sloučeniny
- další druhy používají stejný způsob, ale rychlost respirace je nižší
- fototrofové - fotosyntetické bakterie – produkce O<sub>2</sub> při fotosyntéze
- některé i tak fixují N<sub>2</sub> – heterocysty - nemají část fotosyntézy produkující kyslík - *Anabaena cylindrica* a *Nostoc commune*
- jiné sinice nemají heterocyty a fixují N<sub>2</sub> jen za nízké úrovně osvětlení a kyslíku (např. *Plectonema*)



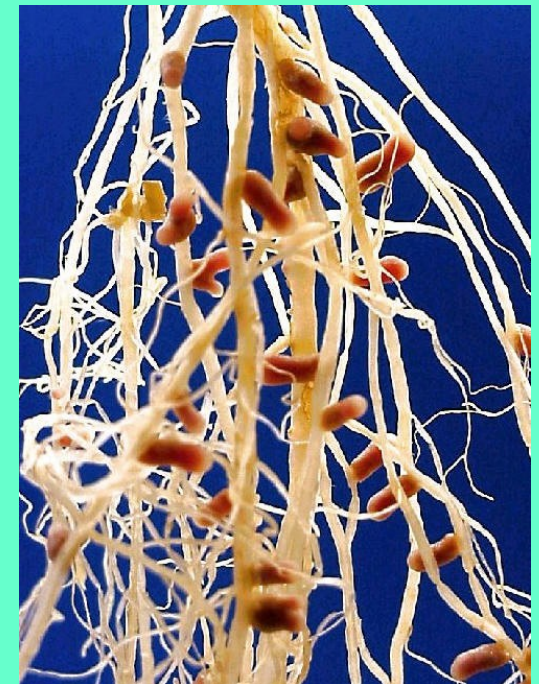
## Hlízková symbióza

- především v čeledi bobovitých , citlivkovitých a sapanovitých
- bobovité rostliny se často sázejí na polích za účelem zvýšení obsahu dusíku v půdě
- bakteriálním symbiontem (fixátorem dusíku) jsou G- tzv. hlízkové bakterie (rhizobia)
- 57 druhů v 12 rodech, nejznámější jsou rody *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* či *Sinorhizobium*
- tvoří vnitrobuněčnou symbiózu s rostlinami
- rostliny obsahují váčky s bakteriemi, kterým jsou dodávány energeticky bohaté organické látky (např. kyselina jablečná a sukcinát) a ionty železa, molybdenu a síry
- rostlina naopak přijímá amonný kationt ( $\text{NH}_4^+$ ) (mutualistické soužití)
- silná hostitelská specifita, jež je realizována lektiny - proteiny na povrchu kořene, které jsou rozpoznávány bakteriálními receptory produkovanými geny Nod



## Hlízka (nodul)

- uměle vytvořený orgán v kořeni - soubor interakcí mezi bakteriemi a hostitelskou rostlinou
- vysoký obsahu proteinu leghemoglobinu- růžové zbarvení
- bakterie najdou svou rostlinu po směru koncentračního spádu flavonoidů
- sek. metabolity, které aktivují některé bakteriální geny (tzv. Nod geny)
- díky nimž bakterie začne syntetizovat vlastní lipooligosacharidy
- na tyto látky zareaguje rostlina diferenciací speciálních dělivých pletiv (hlízkové meristémy), které zahájí tvorbu hlízky
- bakteriálními signály dochází k ohnutí kořenového vlásku, narušení BS a kontaktu bakterie s endopl. retikulem hostitele
- prorůstáním membrány infikovaným kořenovým vláskem
- vzniká infekční vlákno, které proniká do dalších rostlinných buněk
- kde se odškrcejí váčky s jednotlivými bakteriemi
- bakterie (nyní již nazývané bakteroidy) se následně zvětšují a mění tvar



**Rhizobium** - leguminózy, čeleď *Fabaceae*

- kyslík je vázán na leghemoglobin v kořenových hlízkách a dodáván v množství, které nepoškodí nitrogenázu

**Frankia** – hlízkám podobné struktury – v nich frankie vytváří struktury podobné heterocystám – fixace N<sub>2</sub>

- Frankie také produkují hemoglobiny, ale jejich role méně prozkoumaná než u rhizobií
- na první pohled se může zdát, že infikují skupiny nepříbuzných rostlin (olše, přesličník přesličkolistý, latnatec, vřesna bahenní, dryádky)
- revize fylogeneze kvetoucích rostlin prokázala těsný vztah těchto druhů a leguminóz

**Sinice** – existují i symbiotické sinice – některé s houbami (lišejníky), s játrovkami, kapradinami a cykasy

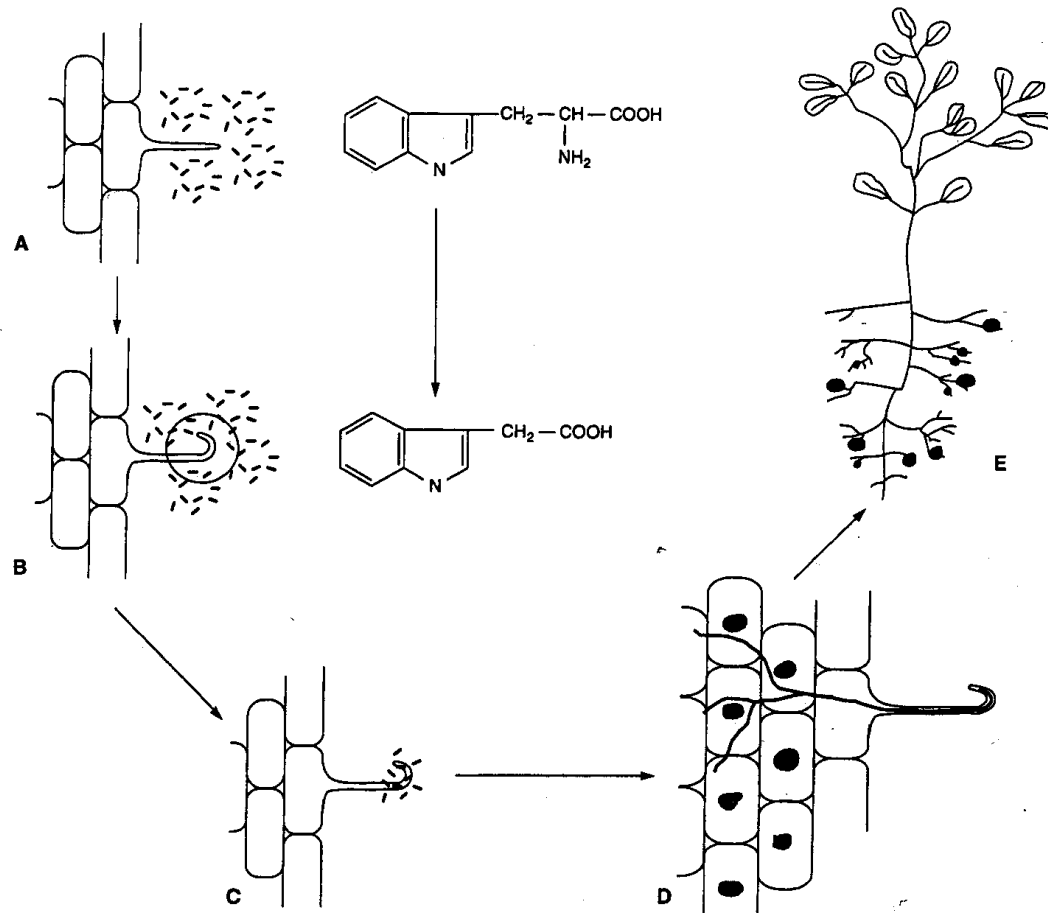
- nevytváří hlízky, mnohdy tyto rostliny ani nemají kořeny
- asociace s kapradinami jsou i významné ze zemědělského hlediska - *Azolla* s *Anabaena* - rýže





## Symbiotická fixace dusíku

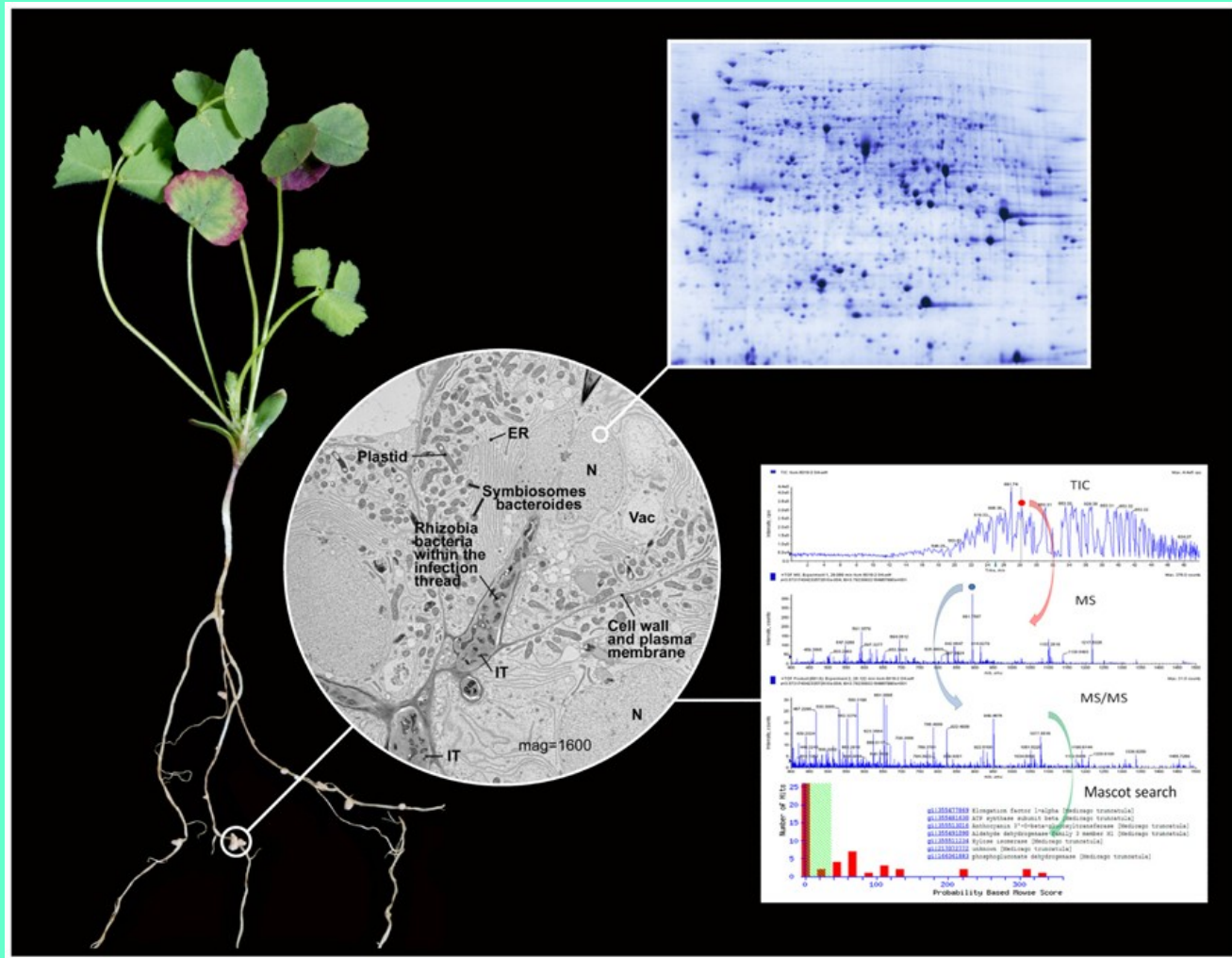
- jeden z nejdůležitějších symbiotických vztahů mezi bakteriemi a rostlinami
- bakteriální buňky proniknou do kořenů vhodné rostliny a vytvoří zde nádoru podobné struktury – hlízky
- nitrogenázový enzymový systém: dinitrogenáza (MoFe protein) a dinitrogenáz-reduktáza (Fe protein)
- chemotaxí ke kořenovým vláskům – rostlinné lektiny (specifická)
- tryptofan z kořenových exudátů rhizobii přeměněn na IAA – ohýb nebo rozvětvení k. vlásku kolem bakterií
- polygalakturonáza depolymerizuje a změkčí buněčnou stěnu kořenových vlásků
- rhizobia do rostlinných buněk – tvorba infekčního vlákna (rostlinný materiál)
- infekční vlákno do kortexu a infikuje tetraploidní buňky, které se začnou množit a vytvoří tkáň hlízky
- rhizobia uvolněna z infekčního vlákna, ztrácí tyčinkovitý tvar, vytvoří bakteroidy a začne fixace dusíku



**Figure 4.8**

Interactions between rhizobia and leguminous plant roots leading to infection and nodule formation. (A) Rhizobia are chemotactically attracted to root hair. Mediated by lectins, some attach to the root hair cell wall. Tryptophan is a component of the root hair exudate. (B) Tryptophan is transformed by the rhizobia to indoleacetic acid (IAA). This plant growth hormone causes the root hair to curl or branch around the attached rhizobia. Polygalacturonase, secreted by the rhizobia or possibly by the plant, depolymerizes and softens the root hair cell wall. (C) Rhizobia gain entry into the root hair cell. The root hair cell nucleus directs the development of the infection thread. (D) The infection thread, a tube consisting of cell membrane and surrounding cellulosic wall, grows into the root cortex and infects some tetraploid cells that proliferate and form nodule tissue. The rhizobia are released from the infection thread, lose their rod shape, become irregularly formed bacteroids, and commence nitrogen fixation. (E) Nodulated leguminous plant.

## *Sinorhizobium meliloti* on the roots of the legume *Medicago truncatula*



The central micrograph shows the cellular components of *M. truncatula* root nodule during an early stage of infection and at a magnification of 1600. Clearly visible and labeled are traditional organelles such as the nucleus (N), vacuole (Vac), endoplasmic reticulum (ER), plastid (P) containing starch grains, and cell wall/plasma membrane. The micrograph provides an image of the rhizobia infection thread (IT) which results from the invagination of the cell wall/plasma membrane and contain rhizobium bacteria. Bacteroides are formed as the bacteria segregate from the infection thread and enter the cell and are encapsulation by a symbiosome plant membrane. The number of bacteroides generally increases with the maturity of the nodule cell.

## *Azorhizobium*

- hlízky na kořenech a stoncích rostlin *Sesbania rostrata* (tropy)
- schopné využívat atmosferický dusík i volně
- rhizobia – volně v půdě, ale málo a nefixují

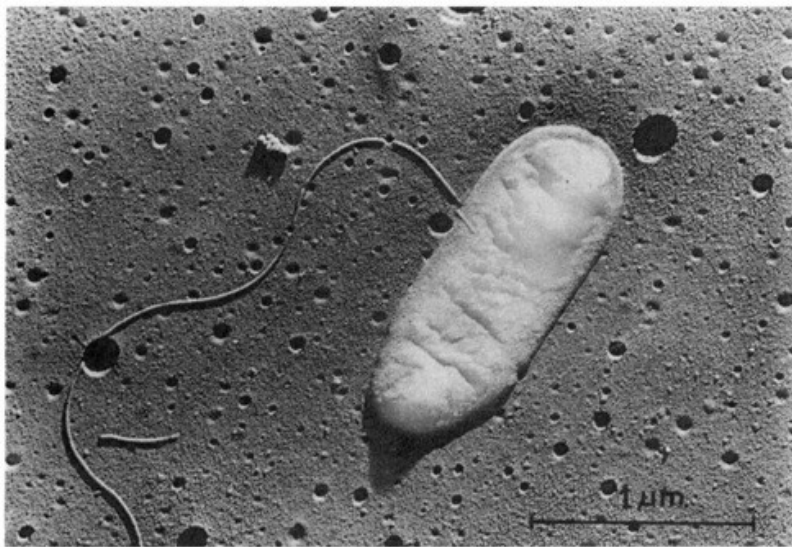
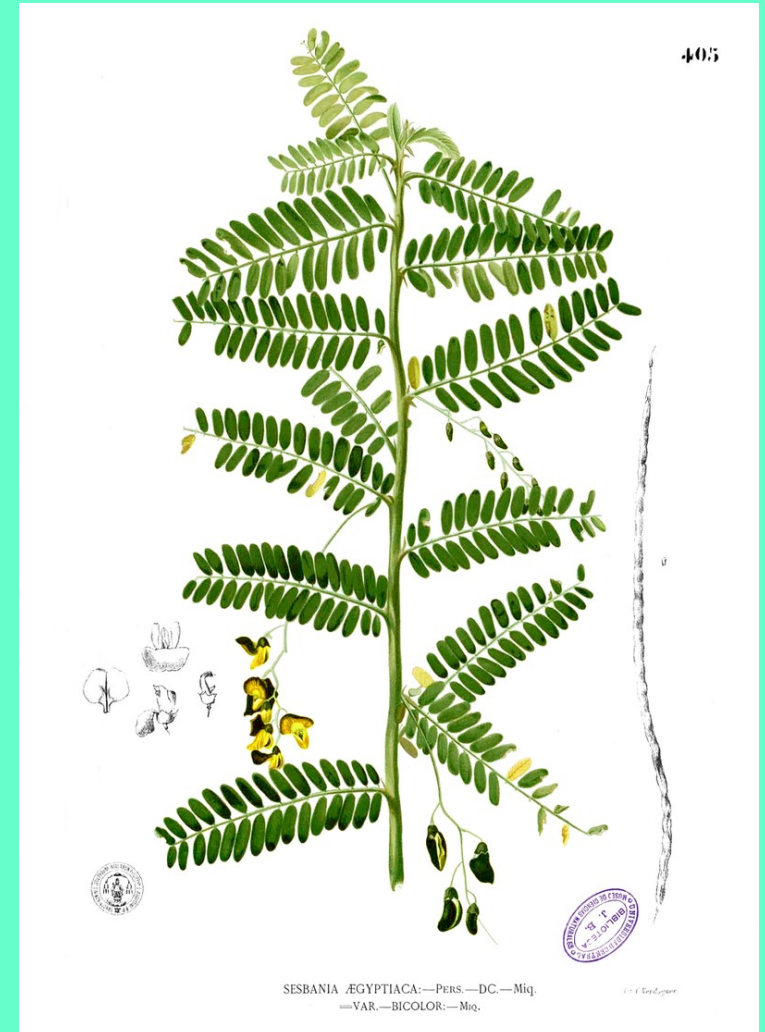
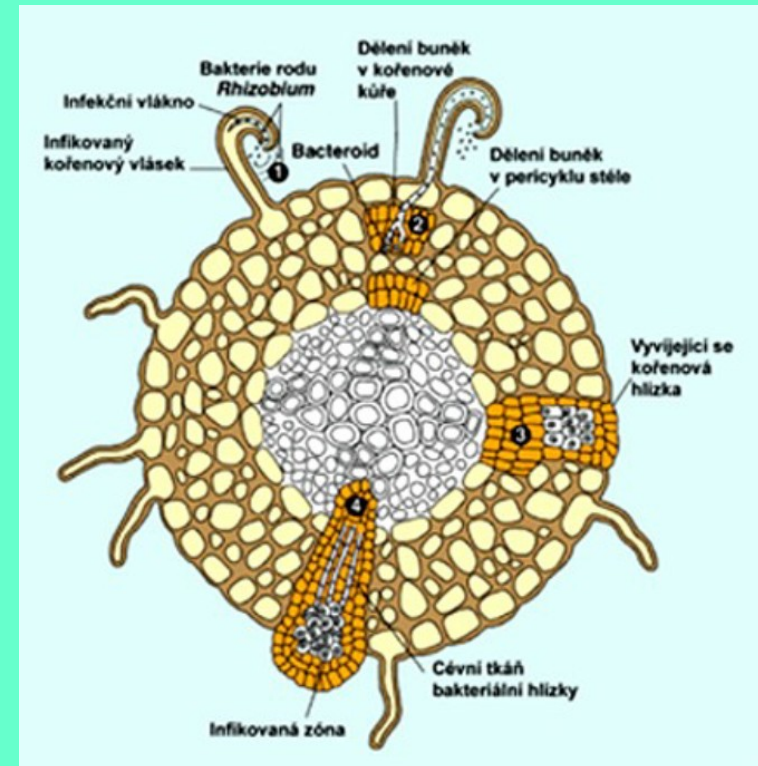


FIG. 3. Electron micrograph of negatively stained *Azorhizobium caulinodans* ORS 571<sup>T</sup> grown in liquid medium.

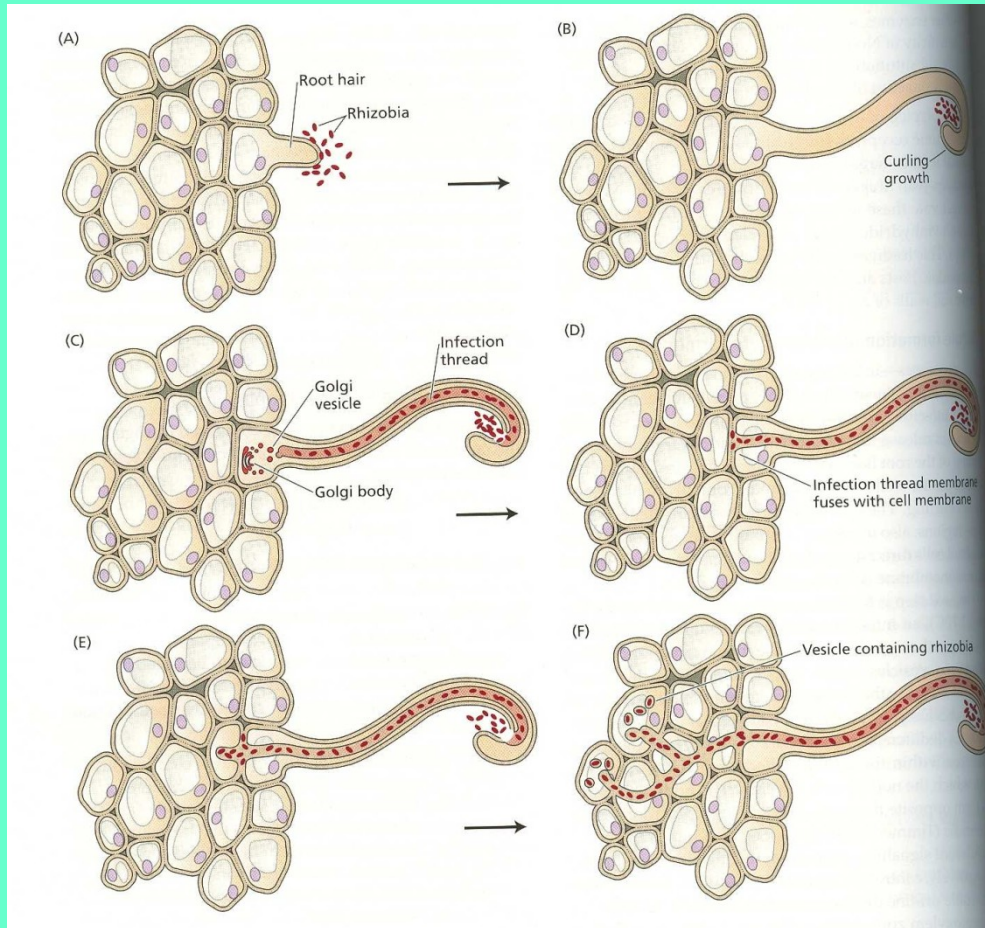


## Vztah *Rhizobium* – hostitelská rostlina

- oboustranně specifický vztah
- rhizobia a bradyrhizobia přitahována AK a dikarboxylovými kyselinami v kořenových exudátech a také velmi nízkými koncentracemi látek - flavonoidy
- lektiny -rostlinné proteiny s vysokou afinitou ke karbohydrátovým skupinám na povrchu vhodných rhizobií – specifické mediátory - přichycení rhizobií k kořenovým vláskům
- flavonoidy a isoflavonoidy vylučované rostlinou indukují expresi nod genů v rhizobiích – enzymy biosyntézy substituovaných lipooligosacharidů, Nod faktorů
- exkretovány, způsobí ohnutí kořenových vlásků a dělení meristematických buněk vedoucí k vytvoření hlízky
- v hlízce buňky s bakteroidy jsou tetraploidní, mezi nimi i normální buňky které spojují hlízky s kořenovým cévním systémem
- při přeměně rhizobiální buňky na bakteroid dochází k degeneraci bakteriálního chromozómu – bakteroid se nemnoží

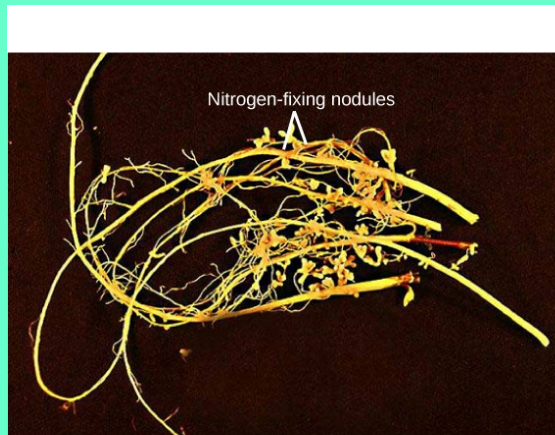


- tvorba nitrogenázy v bakteroidu – rostlina hraje roli v zahájení a kontrole její syntézy
- hlízky – červenohnědé - díky leghemoglobinu – nosič elektronů
- zásobuje bakteroid kyslíkem pro tvorbu ATP a zároveň chrání nitrogenázu proti kyslíku
- hemová část kódována rhizobiem, globinová část rostlinou



## Neleguminózní dusík fixující mutualistické vztahy

- s rhizobii, sinicemi a aktinobakteriemi
- *Rhizobium* a tropický strom *Trema* – pionýrská rostlina
- v tropických a subtropických oblastech *Frankia alni* – také tvoří hlízký na kořenech stromů
- v mírném a subpolárním pásmu část hyfy se diferencuje do tzv. vesicles – fixace N<sub>2</sub>
- *Frankia* fixující dusík vytváří vezikula i bez rostliny v čisté kultuře
- s rody: *Alnus*, *Hippophae* - rakytník rešetlákový (10x víc C než v pomerančích)



(a)



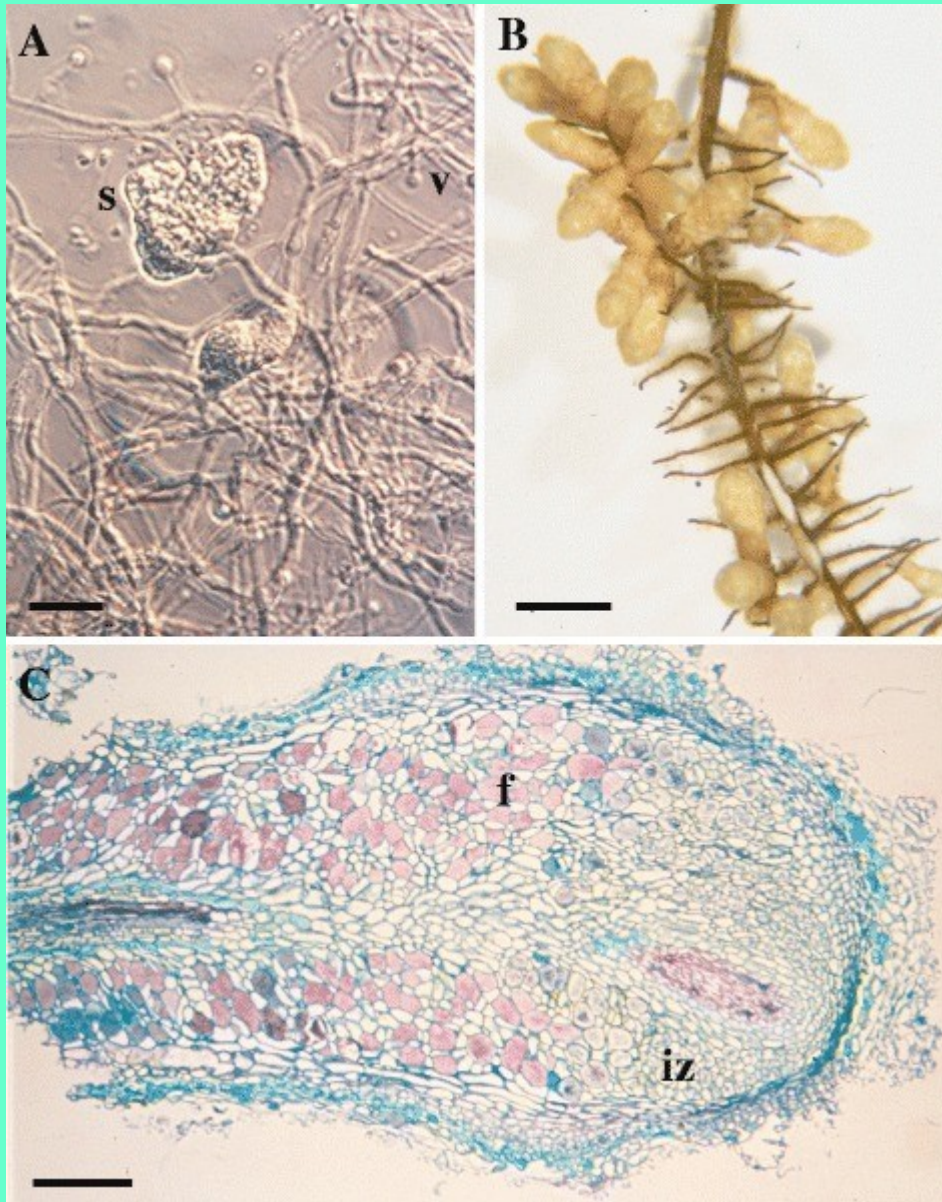
(b)



*Casuarina* – v tropické a subtropické oblasti Austrálie  
s *Frankia*







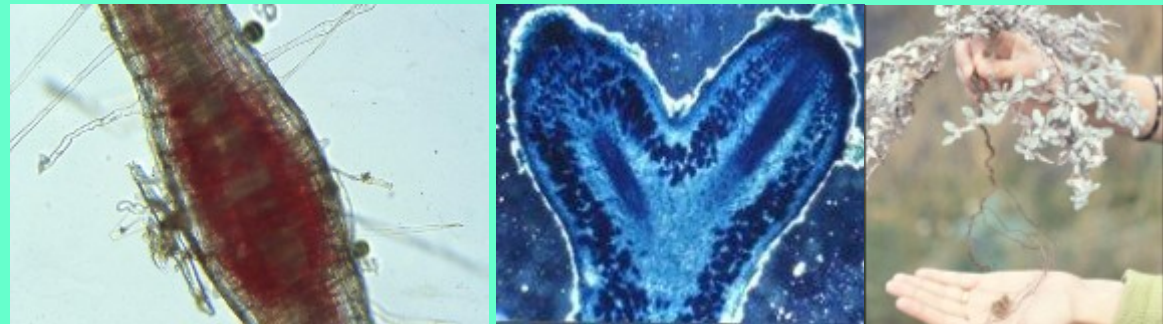
Frankia and actinorhizal nodules a Frankia in pure culture; nitrogen-fixing vesicles 2-6 mm (v) and sporangia (s) can be observed.

b Actinorhizal multilobed nodules on the root system of the actinorhizal plant *Allocasuarina verticillata*.

c Pseudolongitudinal section of a nodular lobe from *A. verticillata*; the nitrogen-fixing zone contains large cells filled with Frankia (f), and the infection zone (iz) is located in the apex of the nodular lobe.

## *Dryas* – dryádka

- trvalka (bylina) arktických a alpinských oblastí
- hyfy aktinobakterie pronikají kořenem, stimulace buněk kortexu – dělí se
- klastry a formují vezikula na koncích hyf
- v okolí infikovaných buněk je indukováno kořenové primordium, které roste do kortexu
- aktinobakterie vnikne do meristematičkých buněk primordia a skrz produkované látky stimulují další vývoj primordia
- dichotomické dělení vrcholu meristému vytvoří klastry laloků zvaných rhizothamnoion



A cortex swelling called « prenodule », that constitutes the first step in the establishment of the nodule, longitudinal cut of an alder nodule, stained with cotton blue in order to visualize cortical cells full of *Frankia* vesicles.

<http://www.ecologiemiicrobiennelyon.fr/spip.php?article677&lang=en>

- fixace N i ve fylosféře terestriálních rostlin včetně konifer
- část N fixovaného v „phylloplane,, zůstane v korunách stromů a je recyklována zdejší mikroflórou
- část se spláchne do půdy, část přijata přímo listy, část zkonzumována býložravci
- některé bakterie mohou infikovat listy čeledi *Myrsinaceae* a *Rubiaceae*, vytvořit na nich listové hlízky, některé schopné fixace N



## Interakce mikroorganismů se vzdušnými částmi rostlin

- stonky, listy a ovoce – epifytní mikroflóra
  - heterotrofní a fotosyntetické bakterie, houby (především kvasinky), lišejníky a některé řasy
  - fylosféra – habitat/prostředí přiléhající k povrchu listů
  - fyloplán – přímo povrch listů
- 
- na jehličnanech – *Pseudomonas (fluorescens)*
  - populace bakterií z jehličnanů využívají jako zdroje C cukry a alkoholy
  - ve srovnání s mikroflórou opadanky – zde víc lipolytické a proteolytické aktivity

### žito – sezónní změny

- květen – xantomonady a růžové chromogeny
- červenec – xantomonady a pseudomonady
- září – xanthomonady
- říjen – listerie, stafylokoky

### kvasinky jsou častou mikroflórou listů

- *Sporobolomyces roseus*
- *Rhodotorula glutinis*
- *R. mucilaginosa*
- *Cryptococcus laurentii*
- *Torulopsis ingeniosa*
- *Aureobasidium pullulans*



- mikroflóra listů včetně kvasinek bývá často pigmentovaná– ochrana proti UV
- mikroflóra odolnost stresu – sucho, teplo– specializované ochranné buněčné stěny
- speciální způsoby rozšiřování na další listy – např. hmyz přenáší mikroorganismy z plodu na plod (octomilka a kvasinky)

někdy i těsný synergický vztah mezi mikroorganismem, hmyzem a rostlinou:

- jeden druh fíkovníku (*Calimyrna*) musí být opylen speciální fíkovou vosou (*Blastophaga psenes*)
- ta infikuje fík kvasinkou *Candida guilliermondii* var. *carpophila* a bakterií *Serratia plymuthica*
- které se zde pomnoží, ale nezpůsobují kažení fíku

<https://www.youtube.com/watch?v=oSuoH72jpeo>



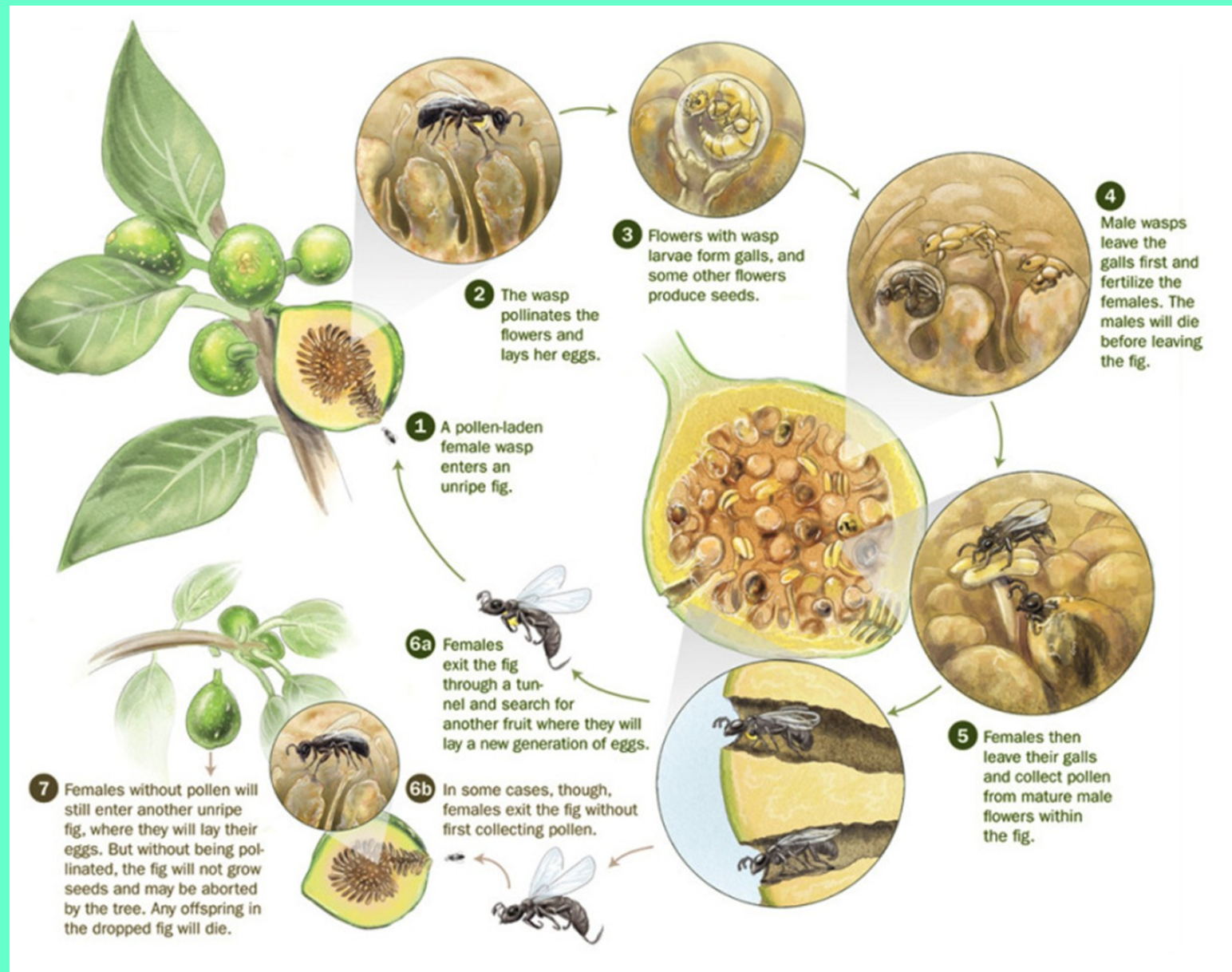


Schéma vztahu mezi fíkovníkem a opylovací vosičkou. Samice fíkovnice s pylem fíkovníku vstupuje do sykonia, kde klade vajíčka do některých samičích květů. Současně tyto i ostatní květy opyluje. Jakmile splní svůj úkol, zahyne a v sykoniu se vyvíjejí její larvy obou pohlaví i několik semen fíkovníku. Po nějaké době se vylíhnou mladé vosičky. Samci kopulují se svými sestrami a zahynou. Oplozené samice opouštějí sykonium, cestou však na sebe nanosí pyl fíkovníku.

## Mikroflóra květů

- krátkodobý habitat pro epifytní mikrofloru
- zde často *Candida reukaufii* a *C. pulcherrima*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*
- po opylení a během zrání se podmínky a s nimi i mikrobiální populace mění – často pak dominantní *Saccharomyces*

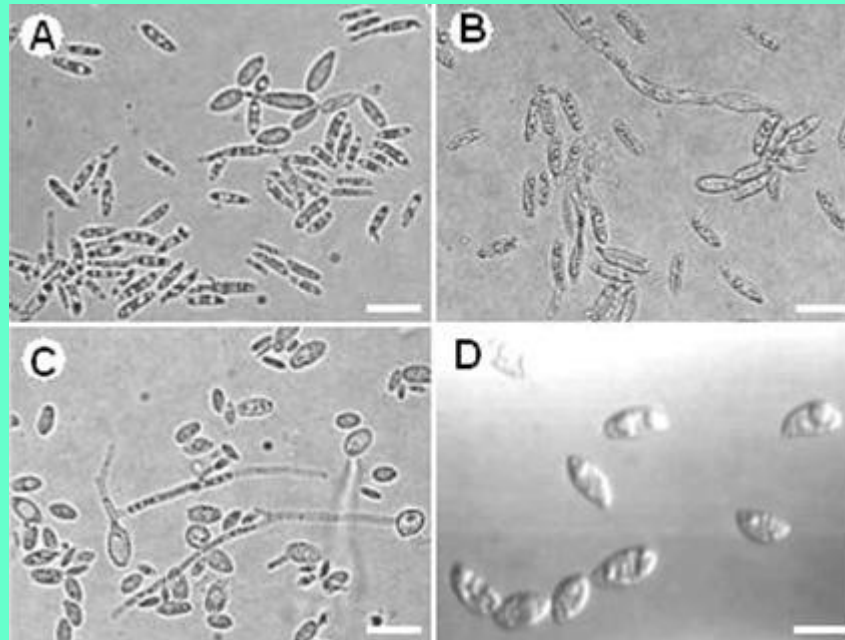
## Pozitivní a negativní vztahy mezi mikrobiálními populacemi na rostlinném povrchu:

- osmofilní kvasinky sniží koncentraci cukrů a připraví prostředí pro jiné mikroorganismy
- nenasycené mastné kyseliny produkované kvasinkami inhibují G+ bakterie
- bakterie na ovoci závislé na růstových faktorech (thiamin, kyselina nikotinová) produkovaných kvasinkami
- kvasinky závislé na růstových faktorech produkovaných bakteriemi
- mikroorganismy rostou na kůře stromů – lišejníky a houby (*Myxomycetes* – *Licea*, *Trichia*, *Fuligo*)



## Houby na listech

- *Sporobolomyces* - asi neúspěšnější houba na povrchu listů
- produkce ballistospor – střílí z listu na list
- mnoho dalších hub izolováno z fylosféry: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Deuteromycota*
- některé alochtonní (normálně se nachází v půdě)
- některé patogenní (*Alternaria*, *Epicoccum*, *Stemphylium* – dobře rostou pouze za příznivých podmínek)
- počet a druhové složení mikroflóry dle ročního období (sezónnost) a věku listů
- *Ascochyta*, *Leptosphaeria*, *Pleospora*, *Phoma* – saprofyt – začne víc růst až na začátku senescence listů

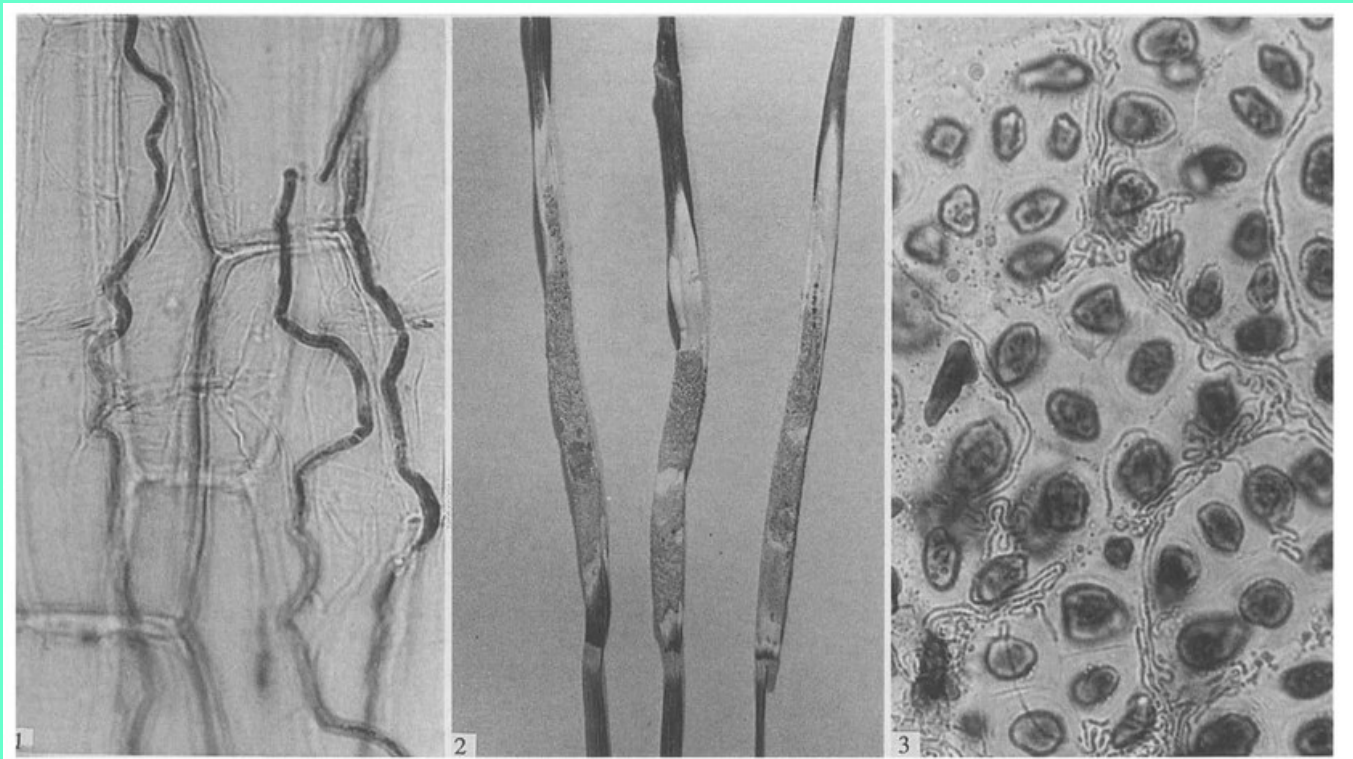


*Sporobolomyces*



## Některé houby mohou růst intercelulárně v travách čeledi *Poaceae* a chránit je proti herbivorům

- kostřava rákosovitá (*Festuca arundinacea*) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) s houbami *Acremonium coenophialum* a *A. Lolii*
- endofyt nezpůsobuje žádné příznaky nemoci, získává fotosyntetáty a syntetizuje alkaloidy jako ergopeptidy, loliny, lolitremy a peraminy
- jsou jedovaté nebo alespoň odpudivé pro nematody, mšice a další hmyz a býložravce
- **Lolitremy** jsou zvlášť silné neurotoxiny - mohou způsobit ztráty na dobytku



**Kostřava rákosovitá**

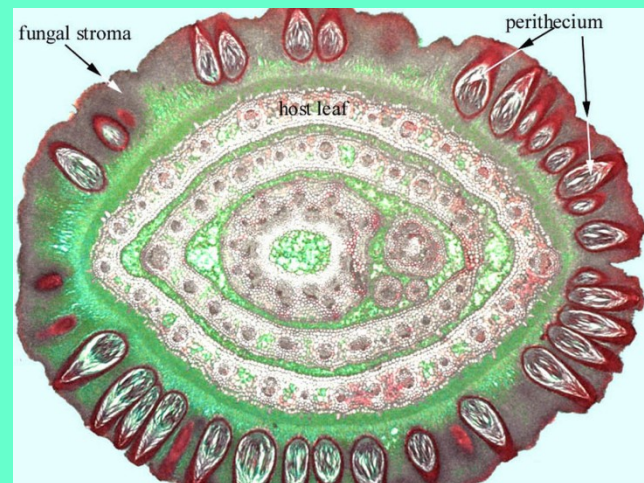


**Jílek vytrvalý**



# Acremonium

- není známá volně žijící forma, není infekční
- není známé sexuální stádium – *Deuteromycota*
- množí se (udrhuje se) semeny trav – tyto obsahují endofyta
- endofyt se dá odstranit skladováním semen při vyšší teplotě
- je velice podobné *Epichloe typhina* - plíseň dusivá, parazituje na stéblech a pochvách trav
- také asymptomatický endofyt až do kvetení trávy – zde se projeví, mycelium se objeví vně a zastaví kvetení
- možná se *Acremonium* vyvinulo z tohoto parazita



## Snět kukuřičná - 1970

*(Helminthosporium maydis) – Ustilago maydis*

Destrukce 10 mil akrů kukuřice (4 mil. ha – 40 tis km<sup>2</sup> – ½ ČR)

### ARTICLES

The Southern Corn Leaf Blight Epidemic

L. A. Tatum 1

A dramatic shift in the genetics of host-parasite interaction and balance occurred in the U.S. corn crop in the 1970 growing season. Southern corn leaf blight incited by *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miyake evolved from a minor disease that causes an average annual loss of less than 1 percent, to one that caused more than the 12 percent average expected from all diseases of corn in the United States.

In 1970 the losses to corn leaf blight approaches 710 million bushels (cca 36 litrů).

Reserves of corn and other grains ease the impact on the economy and food supplies but there are important domestic and foreign effects of the loss.

The epidemic illustrates the vulnerability of our food crops to pests.



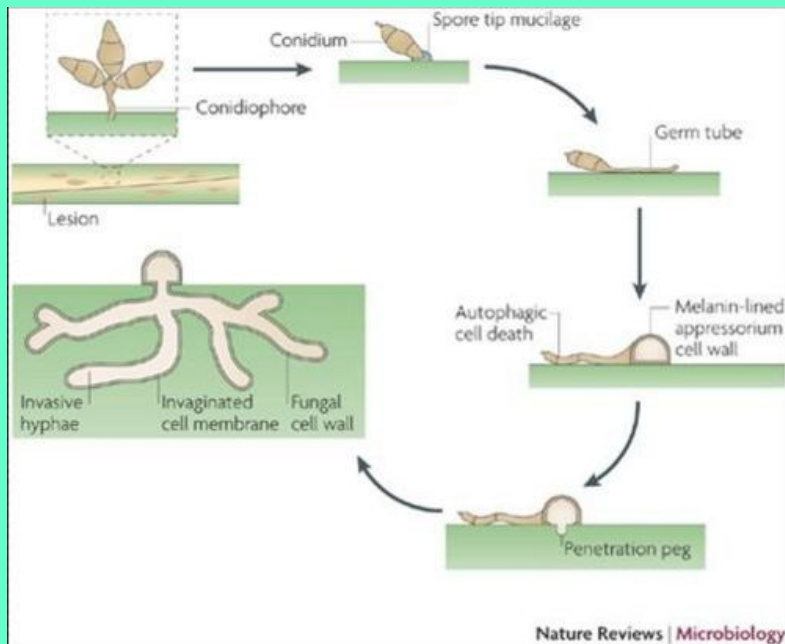
## Bakterie způsobující tvorbu ledových krystalů na rostlinách

- některé kmeny *Pseudomonas syringae* a *Erwinia herbicola* produkují povrchový protein, který může zahájit tvorbu ledových krystalů
- při teplotě -2 - -4 oC se formují ledové krystaly-poškození a bakterie pak zkonsumují rostlinu
- při nahrazení jinou mikroflórou krystaly až při teplotách -7 - -9oC
- genetické inženýrství „ice-minus“ *P. syringae*
- [https://www.youtube.com/watch?v=hKT\\_SGK2qtY](https://www.youtube.com/watch?v=hKT_SGK2qtY)



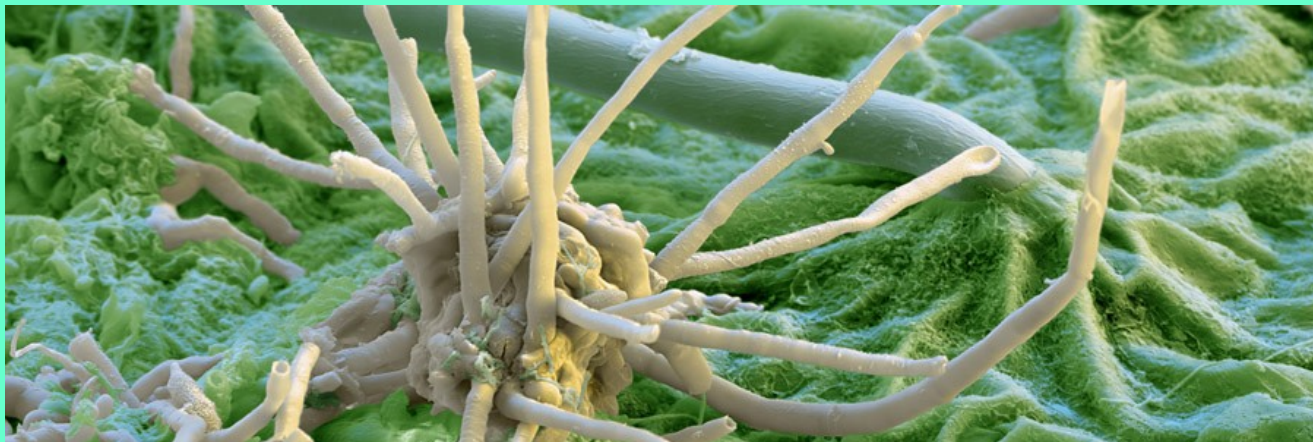
## Přenos patogena na rostlinu

- patogenní mikroorganismus se dostane do styku s rostlinou buď v rhizosféře nebo častěji fylosféře
- většina houbových patogenů se šíří vzduchem– kontakt s listy nebo stonkem/kmenem
- viroví patogeni přenášení především hmyzem
- také půdní fauna (nematoda)
- pohybliví bakteriální (*Pseudomonas*) a houboví (*Oidium*) patogeni přítomní v půdě také vstupují kořeny (chemotaxe)
- přichycení houbových spor přenášených větrem - konidiospóry askomycety *Magnaporthe grisea* (zničí tolik rýže, co by stačilo k obživě 60 mil. lidí)
- přichytí k hydrofobním povrchům jako je listová kutikula pomocí slizu ve vrcholu spory
- vlhký vzduch nebo rosa způsobí bobtnání slizu, vrchol spory praskne a přilepí sporu ke kutikule



konidiospory *Botrytis cinerea* ve dvou fázích:

- hydratovaná ale neklíčící konidiospora se přichytí povrchu listů slabými hydrofobními interakcemi
- hydrofobnost povrchu podporuje toto počáteční uchycení (surfaktanty jej silně inhibovaly)
- za několik hodin konidiospory začnou klíčit a je vylučována látka (glukóza, galaktózamin, proteiny) přilnavá k hydrofobním i hydrofilním povrchům (odolává i silným chemickým činidlům)

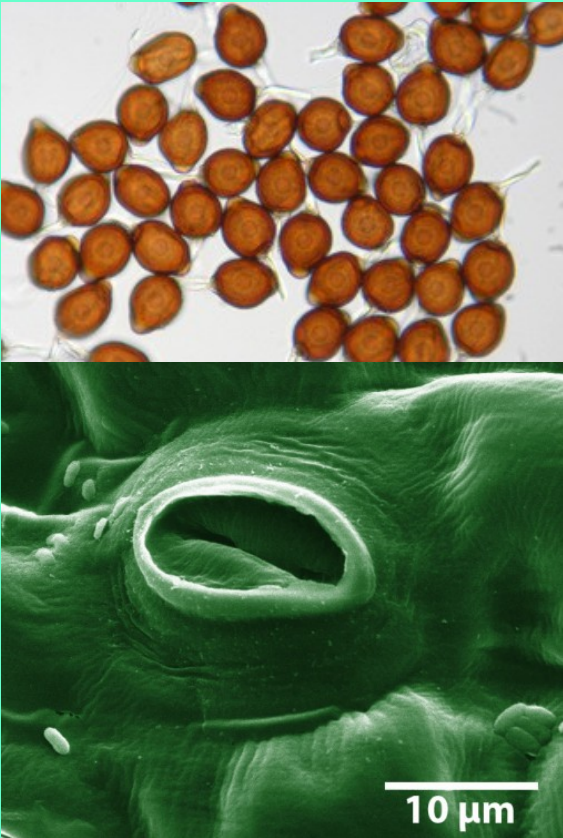


## Další možnosti vstupu patogenů

- poraněními
- přirozenými otvory – stomata – jak rozeznají otvor?

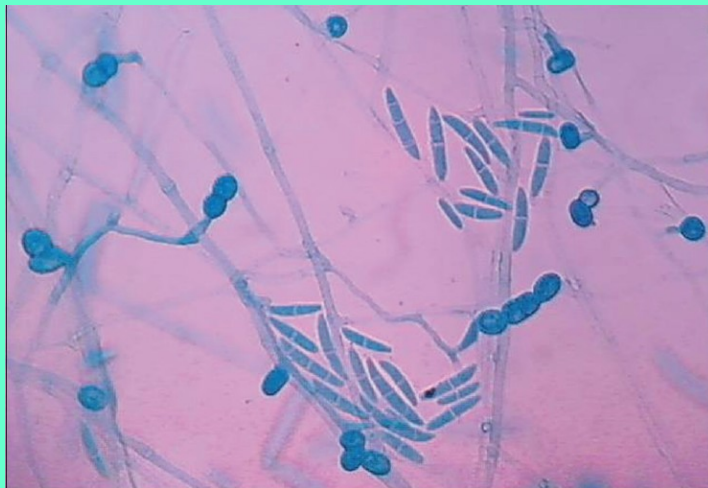
### *Uromyces appendiculatus* (rez na fazolích)

- používá topografický signál – 0,5  $\mu\text{m}$  vysoký hřeben buněk stomatu
- model stomata z polystyrenu – dojde k morfologické diferenciaci a vytvoří se ploché hyfy (appresoria) nezbytné k proniknutí do stomatu
- pokud hřeben nižší než 0.25  $\mu\text{m}$  nebo vyšší než 1  $\mu\text{m}$ , k diferenciaci nedojde

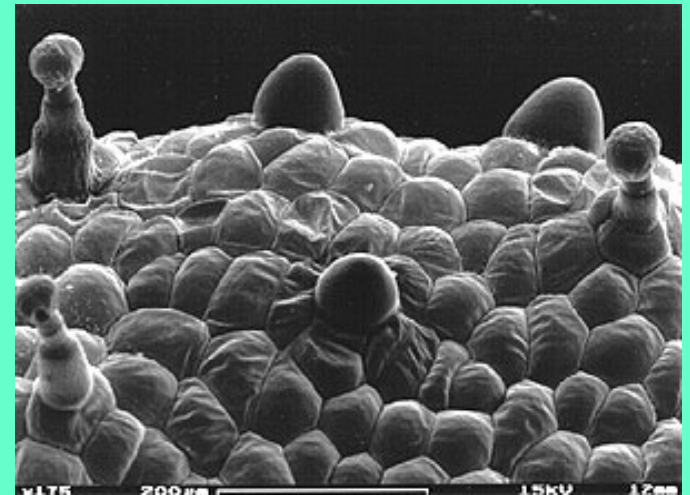
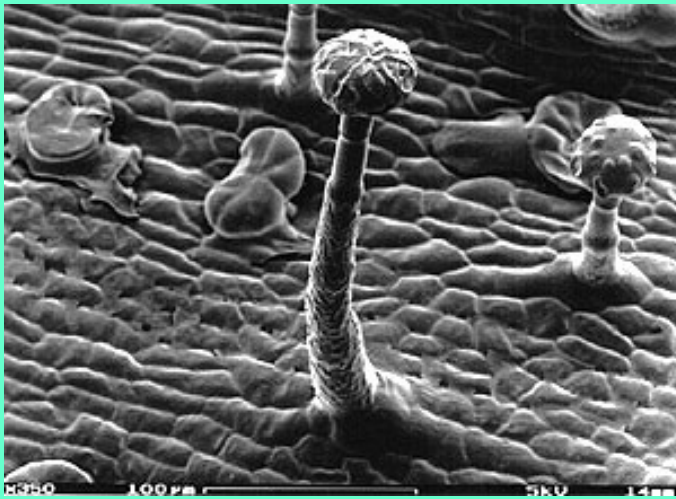




- mnohé viry vstupují ranami způsobenými hmyzem přenášejícím tyto viry
- některé vstupují kořeny s vodou
- někteří patogeni jsou schopni překonat kutikulu bez cizí pomoci
- často atakována enzymaticky, změkčena (padlí – *Erysiphe sp.*, *Botrytis cinerea* – plíseň šedá, ušlechtilá plíseň na vinné révě, *Fusarium solani* – suchá hniloba hlíz)
- po vstupu do hostitele naruší normální funkci rostlin produkcí degradativních enzymů, toxinů a růstových regulátorů
- půdní patogeny produkují pektinázy, celulázy, hemicelulázy jejichž výsledkem jsou hniloby a jiné poranění
- destrukce rostlinných růstových regulátorů má za následek trpasličí formy rostlin, produkce IAA, gibberelinů a cytokininů, tvorbu nádorů (puchýřů) a nadměrný růst stonků do délky



- produkce toxinů narušuje metabolismus rostliny
- někdy jde o nízkomolekulární cyklické peptidy a lineární polyketoly – narušují mitochondrie a buněčné membrány – umožní šíření infekce
- rezistence bývá založena na modifikaci receptoru
- rostliny vykazují různé morfologické nebo metabolické abnormality
- častá reakce na mikrobiální atak je tvorba papillae



# Plant Cells under Attack: Unconventional Endomembrane Trafficking during Plant Defense

by  **Guillermo Ruano** <sup>1,\*</sup>  and  **David Scheuring** <sup>2,\*</sup> 

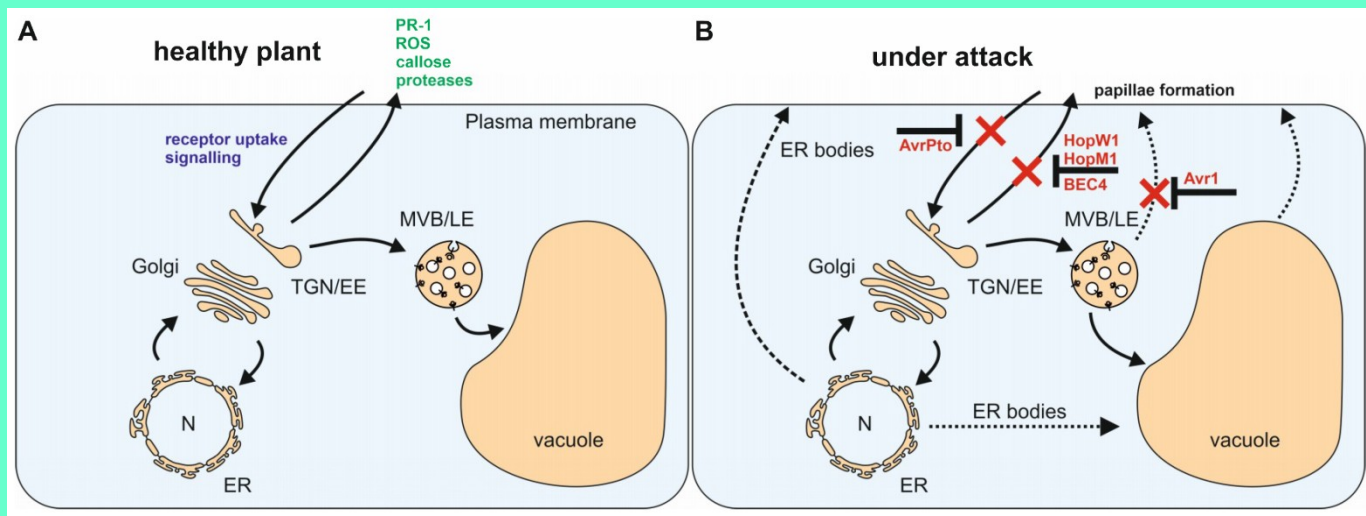
<sup>1</sup> School of Plant Sciences and Food Security, Tel Aviv University, Tel Aviv 6997801, Israel

<sup>2</sup> Plant Pathology, University of Kaiserslautern, 67633 Kaiserslautern, Germany

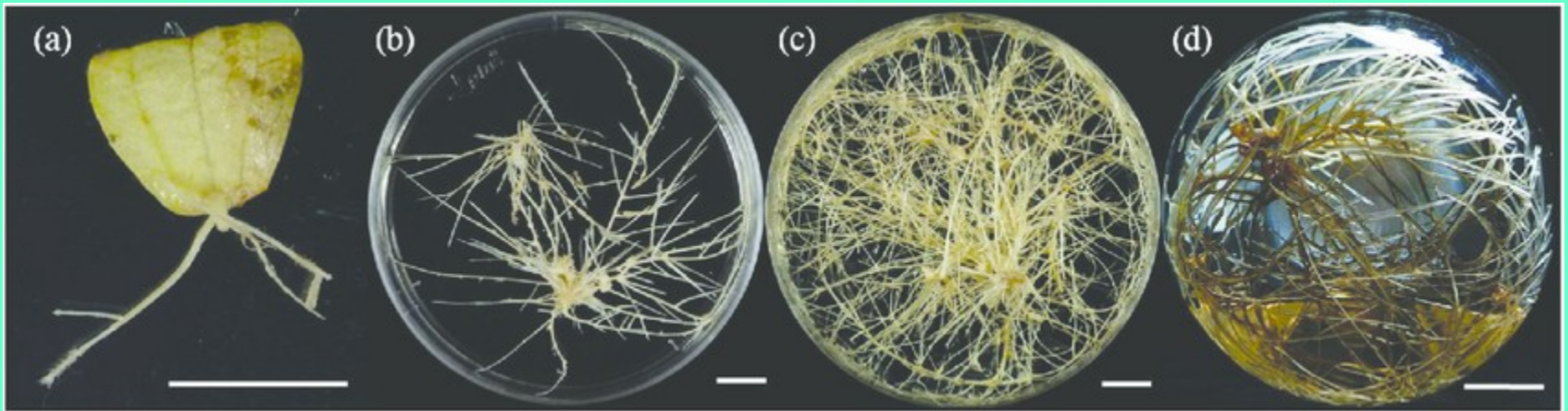
\* Authors to whom correspondence should be addressed.

*Plants* **2020**, *9*(3), 389; <https://doi.org/10.3390/plants9030389>

Received: 26 February 2020 / Revised: 16 March 2020 / Accepted: 19 March 2020 / Published: 21 March 2020



# DĚKUJI ZA POZORNOST



Peter Staněk

<https://www.youtube.com/watch?v=dWPwLATVAhY>