

Mehanizmi interakcije biljaka i gljiva u endotrofnoj mikorizi

Martinčić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:727544>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2020-12-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

SEMINARSKI RAD

**MEHANIZMI INTERAKCIJE BILJAKA I GLJIVA U
ENDOTROFNOJ MIKORIZI**

**PLANT AND FUNGI INTERACTION MECHANISMS IN
ENDOTROPHIC MYCORRHIZA**

Jelena Martinčić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. IZMJENA SIGNALA IZMEĐU GLJIVE I BILJKE I USPOSTAVLJANJE ENDOTROFNE MIKORIZE.....	2
2.1. Strigolaktoni	2
2.2. Myc faktori	3
2.3. Prepenetracijski aparat	4
3. SIGNALNI PUT ENDOTROFNE MIKORIZE.....	5
3.1. SYMRK- kinaza i oscilacije kalcija	5
3.2. Kationski kanali CASTOR i POLLUX	6
3.3. Kinaza ovisna o kalciju i kalmodulinu (CCaMK) i CYCLOPS	7
4. RAZVOJ ARBUSKULA I NJEGOVA FUNKCIJA	9
4.1. Rast hifa unutar korijena biljke	9
4.2. Prijenos hranjivih tvari između biljke i gljive u endotrofnoj mikorizi	10
4.2.1. Metabolizam ugljika u endotrofnoj mikorizi	11
4.2.2. Prijenos dušika u endotrofnoj mikorizi	11
4.2.3. Prijenos fosfata u endotrofnoj mikorizi	12
5. ZAKLJUČAK.....	15
6. LITERATURA	16
7. SAŽETAK.....	18
8. SUMMARY	19

1. UVOD

Endotrofna mikoriza je simbioza gljive i korijena biljke pri čemu hife gljiva tvore mjehuraste, jajaste ili razgranate strukture unutar korijena biljke koje sudjeluju u izmjeni hranjivih tvari između biljke i gljive. Arbuskularna mikoriza (u daljnjem tekstu AM) je simbioza između biljaka i gljive iz reda *Glomeromycota*. Smatra se da su se te gljive razvile prije oko 400 milijuna godina (Remy i sur. 1994), a specifične su po tome što životni ciklus ne mogu završiti bez biljnog korijena kao domaćina pa je moguće da je i AM prisutna još od tog doba.

AM spada u endotrofnu mikorizu jer se dio gljivinih hifa nalazi unutar korijena biljke gdje stvaraju arbuskule- razgranate subcelularne strukture nalik na drvo. Takve arbuskularne strukture su glavno mjesto izmjene hranjivih tvari između biljke i gljive. Gljiva biljku opskrbljuje najčešće fosfatima i vodom, a za uzvrat od biljke dobiva ugljikohidrate i lipide. Smatra se da gljiva tako dobiva čak 20% produkata fotosinteze od biljke s kojom se nalazi u simbiozi (Bago i sur. 2000). Većina kopnenih biljaka uspostavlja AM (čak 70-90%) pa zbog toga ovaj tip mikorize uvelike pridonosi globalnom kruženju fosfata i ugljikohidrata i utječe na produktivnost kopnenih ekosustava (Fitter 2005). AM je posebno važna za biljke u tropskim tlima u kojima je kruženje hranjivih tvari ubrzano pa je njihova stalna koncentracija niska.

Tijekom evolucije, „genetički program“ AM poslužio je kao temelj i za druge simbioze koje uključuju korijen biljke. Funkcionalna adaptacija biljne receptor- kinaze koja je esencijalna za AM utrla je put dušik fiksirajućim bakterijama da uspostave intracelularnu simbiozu s biljnim stanicama. Zato se AM može smatrati pretkom simbioze biljke i dušik fiksirajuće bakterije pa zbog toga AM i simbioza biljke s dušik fiksirajućim bakterijama koriste zajedničke, SYM (od symbiosis= simbioza) gene (Paszkowski 2006).

U zadnjih nekoliko godina endotrofna mikoriza je područje koje se sve intenzivnije istražuje i sve je više radova koji se bave tom temom. Zahvaljujući tome otkrivene su komponente SYM puta, signalne molekule koje otpušta biljka i koje potiču hife gljive na grananje te mnoge druge komponente ovog zanimljivog prirodnog fenomena.

2. IZMJENA SIGNALA IZMEĐU GLJIVE I BILJKE I USPOSTAVLJANJE ENDOTROFNE MIKORIZE

Kako se simbiotski partneri pronalaze? Korijen biljke konstantno otpušta kompleksnu mješavinu supstanci koja sadrži različite signalne molekule koje su prepoznate od strane mikroorganizama. Ti signali mogu privući, osim potencijalnih simbiotskih mikroorganizama, i potencijalne patogene ili saprotrofe. Zbog toga biljka mora prepoznati potencijalne simbiote i potaknuti njihov rast prema biljci i omogućiti kolonizaciju biljke. Istovremeno biljka mora odbiti patogene stvaranjem brzog obrambenog odgovora. Nakon prepoznavanja biljnih signala, hife simbionta se počinju intenzivnije granati prema biljci- domaćinu. Pri tome simbiot šalje svoje signalne molekule koje omogućuju lakšu kolonizaciju biljke. Zbog toga su simbiotski signali prije fizičkog kontakta simbionata od primarne važnosti jer otvaraju vrata simbiotskim interakcijama.

2.1. Strigolaktoni

Prvi signal za uspostavljanje endotrofne mikorize dolazi od biljke. Već dulje vrijeme se zna da određene signalne molekule koje se izlučuju iz korijena biljke stimuliraju rast hifa gljiva koje sudjeluju u endotrofnoj mikorizi, ali tek nedavno je otkriven identitet tih „faktora grananja“ (Akiyama i sur. 2006, Steinkellner i sur. 2007). Otkriveno je da biljni hormoni strigolaktoni (Slika 1.) induciraju grananje hifa gljiva, utječu na fiziologiju gljive, aktiviraju mitohondrije (Besserer i sur. 2006) i stimuliraju klijanje spora kod nekih gljiva koje uspostavljaju endotrofnu mikorizu.

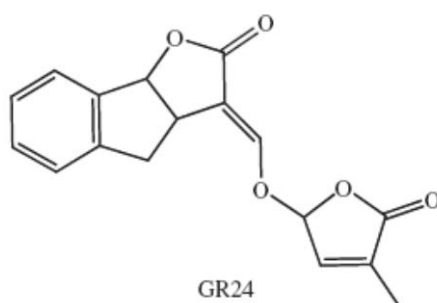
Strigolaktoni spadaju u seskviterpenske laktone. Imaju nestabilnu etersku vezu koja spontano hidrolizira u vodi pa su zato kratko živući u rizosferi i formiraju strme koncentracijske gradijente.

Zanimljivo je otkriće do kojeg je došlo pri pokusima s biljkama koje su rasle u uvjetima visoke koncentracije fosfata (Yoneyama i sur. 2007). Naime, otkriveno je da je u takvim biljkama smanjena sinteza strigolaktona. Grananje hifa u blizini takvih biljaka također je smanjeno, dok je obrnuta situacija kod biljaka kojima manjka fosfata. Takve biljke izlučuju više strigolaktona što povećava grananje hifa i pospješuje kolonizaciju biljnog korijena. Ovi podaci upućuju na to da je kod biljaka koje već imaju uspostavljenu AM i kod onih koje rastu

u dovoljnoj količini hranjivih tvar (prvenstveno fosfata) smanjena kolonizacija korijena povezana sa manjom koncentracijom strigolaktone koji se otpuštaju iz korijena.

Osim strigolaktone, utvrđeno je da i neki flavonoidi uzrokuju pojačano grananje hifa (Steinkellner, 2007) . Ali, pronađeni su kod malog broja biljaka pa je upitna njihova uloga neophodnih faktora grananja.

Smatra se da gljiva strigolaktone percipira pomoću receptora , ali oni za sada još nisu lokalizirani niti je otkrivena njihova proteinska struktura. Strigolaktone se ponašaju kao signalne molekule, ali smatra se i da bi mogli stimulirati proizvodnju simbiotskih signala gljive nazvanih Myc faktori, ali ta povezanost nije dokazana (Akiyama i Hayashi 2006) .



Slika 1. Kemijska struktura sintetskog analoga strigolaktone GR24 (preuzeto iz Akiyama i sur. 2006).

2.2. Myc faktori

Nakon što gljiva prepozna biljne signale, počinje se intenzivnije granati u smjeru biljke i lučiti vlastite simbiotske signale. Trenutno se mnogo truda ulaže ne bi li se identificirale signalne molekule koje otpušta gljiva i koje u korijenu biljke- domaćina uzrokuju odgovor koji vodi k uspostavljanju mikorize. Te molekule su kolektivno nazvane Myc faktori (Kosuta i sur. 2003). Otkriveno je da se radi o topivim molekulama koje mogu difundirati. Naime, u slučaju kada su biljka i gljiva bile odvojene membranom nepropusnom za gljivu, u korijenu biljke *Medicago truncatula* došlo je do aktivacije promotora koji kodira gene odgovorne za uspostavljenje simbioze (Kosuta i sur. 2003).

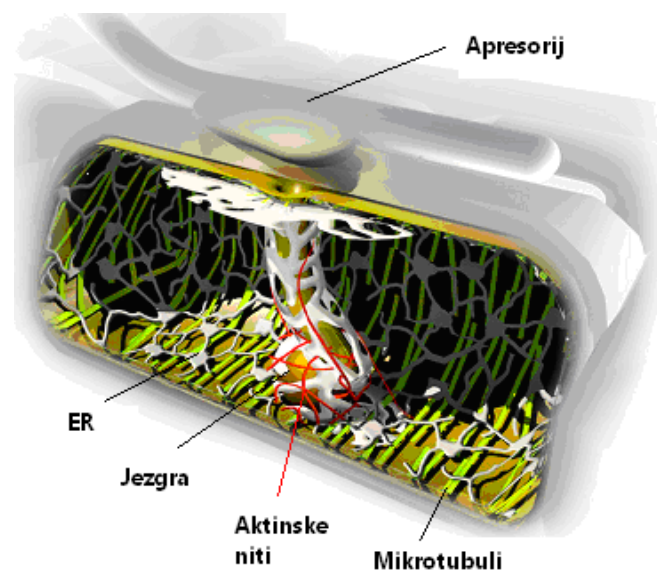
Još uvijek nije poznato o kojim se molekulama točno radi pa je stoga teško i odrediti koji biljni receptori sudjeluju u njihovoj percepciji. Za sada se zna da Myc faktore direktno ili indirektno percipira receptor- kinaza koja sudjeluje i u percepciji molekula koje luče bakterije fiksatori dušika. Zato ta receptor- kinaza predstavlja polaznu točku u zajedničkom simbiotskom signalnom putu, ali o tome će biti više govora u 3. poglavlju.

2.3. Prepenetracijski aparat

Nakon izmjene signala između biljke i gljive, slijedi korak koji je i glavna karakteristika endotrofne mikorize: rast hifa unutar korijena biljke. Ustanovljeno je da u uspješnoj kolonizaciji korijena aktivno sudjeluje i sama biljka pripremajući intracelularni okoliš za hife gljiva. Unutar biljke stvara se prepenetracijski aparat (PPA). To je subcelularna struktura koja određuje put kojim će hifa rasti kroz biljnu stanicu sve do korteksa gdje će tvoriti arbuskule (Slika 2.). Gljive koje stupaju u AM tvore posebnu vrstu apresorija zvanih hipopodiji koji rastu kroz PPA. Četiri do pet sati nakon što je stvoren apresorij, biljka stvara PPA (Genre i sur. 2005).

Razvoju PPA prethodi migracija jezgre u biljnoj stanici prema mjestu za koje se očekuje da će ući apresorij. Nakon toga jezgra migrira ispred formirajućeg PPA usmjeravajući njegov rast kroz stanicu. PPA se sastoji od mikrotubula, mikrofilamenata i endoplazmatskog retikuluma koji zajedno formiraju cijev koja povezuje nadolazeći apresorij i jezgru biljne stanice. Tek nakon formiranja te cjevaste strukture slijedi penetracija hife u biljnu stanicu. Pri tome dolazi do invaginacije biljne plazmaleme pa se apresorij razvija u apoplastnom prostoru koji sadrži ostatke biljne stanične stijenke (Genre i sur. 2005).

Razvoj PPA ne ovisi o Myc faktorima (Genre i sur. 2005). Ne zna se točno koji signali uzrokuju stvaranje PPA. Najvjerojatnije ovisi o određenim kemijskim signalima, ali važni su i sekundarni, mehanički signali koji dolaze iz samog apresorija gljive.



Slika 2. Ulazak apresorija gljive u stanicu epiderme korijena kroz prepenetracijski aparat. Objašnjenje u tekstu (Preuzeto iz Genre i sur. 2005.)

3. SIGNALNI PUT ENDOTROFNE MIKORIZE

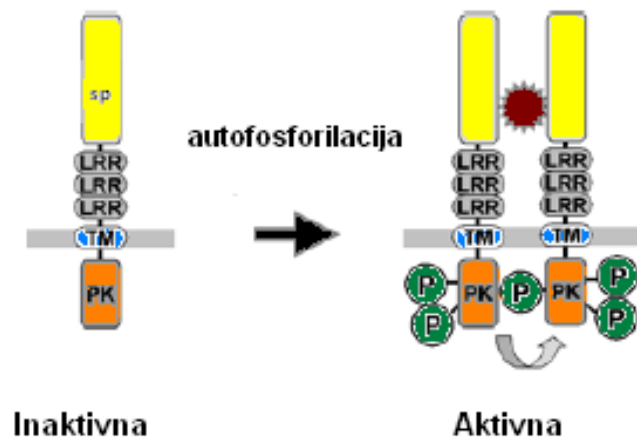
Ključna istraživanja gena koji sudjeluju u uspostavljanju AM vrše se na biljnim mutantima. Najzanimljivija su istraživanja provedena na leguminozama koje ne mogu uspostaviti simbiozu s dušik fiksirajućim bakterijama. Ustanovljeno je da takve biljke ne mogu razviti ni endotrofnu mikorizu. Zato je zaključeno da su za uspostavljanje interakcija u AM i u simbiozi s dušik fiksirajućim bakterijama potrebni zajednički, SYM, geni (Paszkowski 2006).

3.1. SYMRK- kinaza i oscilacije kalcija

Prva zajednička komponenta SYM puta je receptor- kinaza SYMRK (kod *Lotus japonicus*, a poznata i kao DMI2 kod *M. truncatula* ili NORK kod *Medicago sativa*) koja se nalazi unutar plazmatske membrane biljne stanice. Sastoji se od signalnog peptida, tri dijela bogata ponavljajućim leucinom (LRR motiv), transmembranskog dijela i Ser/Thr kinazne domene (Yoshida i Parniske 2005).

Još nisu otkriveni ligandi koji se direktno vežu za izvanstaničnu domenu SYMRK receptor- kinaze, ali Yoshida i Parniske (2005) su utvrdili da tijekom prijenosa signala dolazi do autofosforilacije njene kinazne domene čime se SYMRK aktivira (Slika 3.), a to uzrokuju izvanstanični signali bakterije i gljive. Ne zna se točno na koji način kinaza primi izvanstanične signale simbionata (Myc faktore gljiva i Nod faktore bakterija). Nod faktore vjerojatno ne percipira izravno jer su otkriveni njihovi receptori (NFR5/ NFR1 kompleks), a smatra se da su takvi slični receptori potrebni i za Myc faktore (Yoshida i Parniske 2005).

Nakon što se SYMRK aktivira, primijećeno je da dolazi do oscilacije koncentracije kalcija u unutrašnjosti jezgre i u staničnoj citoplazmi oko jezgre biljne stanice epiderme korijena. I Myc i Nod faktori uzrokuju te oscilacije koristeći isti signalni put, ali one se međusobno razlikuju u frekvenciji i amplitudi, npr. Nod faktori uzrokuju promjene od 443-669 nM kalcija, dok Myc faktor uzrokuje promjene od 75-113 nM kalcija. Takve oscilacije koncentracije kalcija mogle bi biti uzrok primijećenih promjena u ekspresiji gena i fizioloških razlika u odgovoru na signale bakterije i gljive (Kosuta i sur. 2008).



Slika 3. Pretpostavljeni model aktivacije SYMRK. Vezanje liganda ili neki vanjski signal (crveni kružić) za signalni peptid (žuti dio) vodi do autofosforilacije SYMRK i aktivacije kinaze. SP- signalni peptid; LRR- peptid bogat ponavljajućim leucinom; TM- transmembranski dio; PK- kinazna domena. (Preuzeto iz Yoshida i Parniske 2005).

Do oscilacija koncentracije kalcija dolazi u biljnim stanicama prije direktnog kontakta s gljivom odnosno bakterijom. Nakon što se apresorij gljive prihvati za biljnu stanicu, koncentracija kalcijevih iona se vraća u normalno stanje. Primijećeno je da se oscilacije kalcija uzrokovane Nod faktorima ne pojavljuju u stanicama koje već odgovaraju na signale gljive (Kosuta i sur. 2008).

Kosuta i sur. (2008) su otkrili da su oscilacije koncentracije kalcija uzrokovane Nod i Myc faktorima po prirodi nepravilne, kaotične. Kaotični sistemi zahtijevaju minimalnu energiju da bi proizveli širok spektar izlaznih signala kao odgovor na ulazne signale koji se međusobno vrlo malo razlikuju. Ta kaotičnost pridonosi fleksibilnosti koja je potrebna u ovom slučaju kada se dva različita signala (od Myc faktora i od Nod faktora) moraju prevesti istim signalnim putem i na kraju dati različite odgovore.

Kalcijevi ioni prolaze kroz kanale koji još nisu identificirani, a nalaze se u jezgrinom omotaču. Da bi došlo do oscilacija koncentracije kalcija, najprije treba doći do promjena u membranskom potencijalu jezgrinog omotača, a za to su potrebni CASTOR (DMI1 kod *M. truncatula*) i POLLUX kationski kanali (Chen i sur. 2009).

3.2. Kationski kanali CASTOR i POLLUX

CASTOR I POLLUX su homologni geni koji kodiraju za istoimene ionske kanale koji su dio SYM puta kod *L. Japonicus* (Chen i sur. 2009). Ta dva vrlo slična gena vjerojatno su evoluirala duplikacijom prije divergencije monokotiledona i dikotiledona pa zato proteini koje kodiraju dijele sličnu strukturu domena. Najvjerojatnije djeluju kao heteromultimerni kompleks. Još uvijek nije sa sigurnošću utvrđeno gdje se točno ti kanali nalaze. Naime, većina autora smatra da se nalaze u membrani plastida, ali u najnovijim radovima se javlja hipoteza da se nalaze u membrani jezgre (Parniske 2008 i Kosuta i sur. 2008). Pretpostavlja se da to nisu kalcijски kanali, ali najvjerojatnije reguliraju aktivnost takvih kanala jer prenose katione (vjerojatno kalij) i na taj način mijenjaju membranski potencijal.

Kanamori i sur. (2006) su otkrili da su osim CASTOR i POLLUX, za oscilacije koncentracije kalcija odgovorni i nukleoporini koji formiraju pore u jezgri ovojnice. Također spadaju u SYM put prijenosa signala, ali točan molekularni mehanizam još nije poznat. Moguća uloga je da služe kao vrata za prolaz kalcijevih iona ili su na neki način u interakciji s kalcijevim kanalima, moguće preko određenih sekundarnih glasnika. U svakom slučaju, ukoliko se naprave stanice mutante koje ne sadrže nukleoporin, ne može doći do nodulacije niti do uspostavljanja mikorize i ne dolazi do oscilacija koncentracije kalcija ni do aktivacije kinaze koja je osjetljiva na njegove promjene.

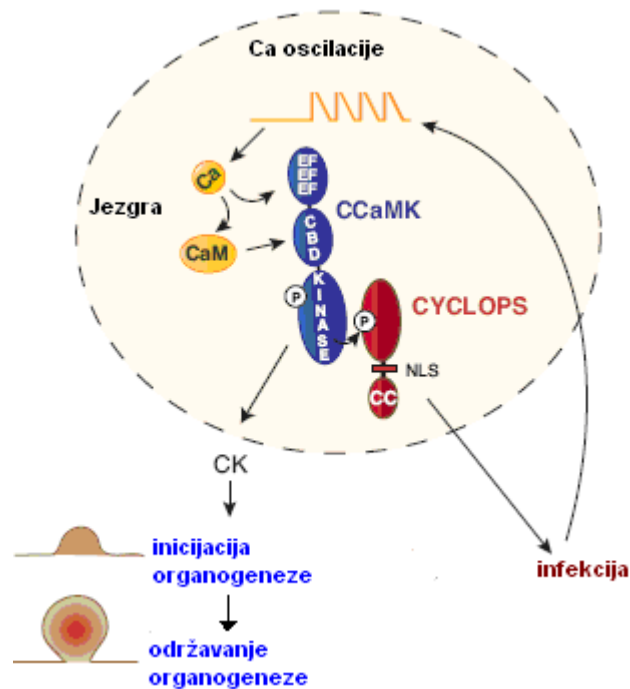
3.3. Kinaza ovisna o kalciju i kalmodulinu (CCaMK) i CYCLOPS

Oscilacije koncentracije kalcija predstavljaju određenu biološku informaciju koju je potrebno dekodirati, odnosno interpretirati. Tu ulogu ima kinaza ovisna o kalciju i kalmodulinu (CCaMK) locirana u biljci u jezgri stanica korijena. Smatra se da je CCaMK glavni regulator organogeneze i razvoja infekcije, ali još se ne zna kompletni molekularni mehanizam (Yano i sur. 2008). Katalitička aktivnost CCaMK je modulirana slobodnim kalcijevim ionima ili kalcijem vezanim za kalmodulin jer sadrži domene za vezanje tih elemenata. Sadrži i kinaznu domenu pa se smatra da oscilacije koncentracije kalcija utječu na fosforilaciju CCaMK (Yano i sur. 2008).

Yano i sur. (2008) utvrdili su da je CYCLOPS protein koji se nalazi u jezgri, a također sudjeluje u SYM putu pri čemu djeluje nizvodno od CCaMK. Kod biljnih mutanata koji ne sadrže CYCLOPS ne dolazi do infekcije gljivom ili bakterijom, ali noduli i arbuskuli se mogu

razviti tako da CYCLOPS predstavlja mjesto grananja: potreban je za infekciju, a nije potreban za organogenezu. CYCLOPS je fosforilacijski supstrat za CCaMK *in vitro* (Slika 4.). Pretpostavlja se da ta dva proteina tvore kompleks koji je potreban za stvaranje infekcije, dok je za organogenezu potreban kompleks CCaMK sa još ne identificiranom molekulom koja bi također mogla biti supstrat za fosforilaciju. Taj put vjerojatno uključuje aktivaciju sinteze citokinina. Citokinin osjeti citokininski receptor LHK1, što dovodi do indukcije diobe stanica, tj. do organogeneze.

Yano i sur. (2008) predlažu hipotetski signalni put prema kojem oscilacije koncentracije kalcija utječu na kinaznu aktivnost CCaMK, a time i na fosforiliranost CYCLOPS proteina. Fosforilacija CYCLOPS proteina utječe na transkripciju gena odgovornih za infekciju gljivom odnosno bakterijom.



Slika 4. Model funkcije CYCLOPS i CCaMK. CCaMK se aktivira tako da se kalcij (Ca) veže za karboksilni kraj i/ili se veže za kalmodulin (CaM) pa se taj kompleks veže za vezno mjesto za kalmodulin (CBD). Oba slučaja vode do aktiviranja CCaMK autofosforilacijom. Tada se signalizacija dijeli na dva moguća puta. U korteksu korijena CCaMK inducira i održava organogenezu za što je potrebna stalno povećana koncentracija citokinina (CK). U stanicama podložnima infekciji bakterijom ili gljivom, CCaMK signalizira putem CYCLOPS da se infekcija održi. Za taj put je potrebna i stalna prisutnost Nod odnosno Myc faktora. (Preuzeto i prilagođeno iz Yano i sur. 2008).

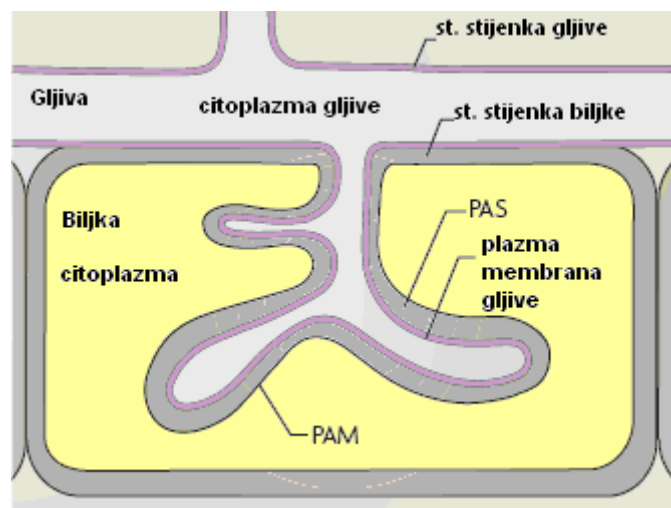
Može se zaključiti da je SYM put potreban samo da bi gljiva inficirala epidermu korijena. Kada se to desi, SYM put više nije potreban da bi gljiva kolonizirala korteks korijena. Dakle, difuzibilni Myc faktor uzrokuje oscilacije koncentracije kalcija prije dodira gljive i korijena biljke. Te oscilacije pripremaju stanice epiderme korijena za gljivinu kolonizaciju (stvaraju PPA). Ako ne dođe do tih oscilacija, gljiva ne može kolonizirati korijen biljke pa ne dolazi do mikorize.

4. RAZVOJ ARBUSKULA I NJEGOVA FUNKCIJA

4.1. Rast hifa unutar korijena biljke

Uspostavljanje endotrofne mikorize između gljive i korijena biljke rezultira razvojem razgranate strukture hifa koje rastu unutar biljne stanice. Te strukture nazvane su arbuskuli, a predstavljaju glavno mjesto izmjene hranjivih tvari između biljke i gljive. Pri tome ne dolazi do miješanja biljne i gljivine citoplazme. Konačna struktura razgranatih hifa ovisi o biljnom i gljivinom genotipu (Karandashov i Bucher 2005).

Hife rastu kroz epidermu i egzodermu korijena sve do unutarnjeg korteksa u čijim se stanicama počinju aktivno granati tvoreći arbuskule. Arbuskuli se uglavnom razvijaju u korteksu biljnog korijena, a rast kroz epidermu omogućuje već spomenuti prepenetracijaki aparat. Unutrašnjost hifa ostaje odvojena od biljne citoplazme periarbuskularnom membranom. Ta membrana se nastavlja na plazmatsku membranu biljke i cijelom dužinom obavija hife. Iako je fizički dio plazmatske membrane, ima različit sadržaj proteina. Prostor između gljivine plazmatske membrane i periarbuskularne membrane se naziva periarbuskularni prostor. I gljivina membrana i periarbuskularna membrana imaju potencijal za stvaranje stanične stijenke pa periarbuskularni prostor sadrži materijal stanične stijenke od oba simbionta (Slika 5.) (Parniske 2008).



Slika 5. Građa arbuskula. Opis slike nalazi se u tekstu. PAM- periarbuskularna membrana; PAS- periarbuskularni prostor. (Preuzeto iz Parniske 2008).

Arbuskuli imaju kraći životni vijek od stanice domaćina tako da biljna stanica-domaćin može biti kompetentna za nekoliko ciklusa invazije gljive. Arbuskuli rastu do određene maksimalne veličine, nakon čega slijedi njihova degradacija odnosno starenje. Tada se stvore pregrade između dijela hifa koje tvore arbuskule i ostalog dijela gljive. S vremenom arbuskul propadne i na kraju nestane (Hause i Fester 2005).

U nedavnim istraživanjima otkriveno je da životni vijek arbuskula ovisi o tome kolika je njegova sposobnost da prenosi fosfate. U slučaju mutacije PT4 fosfatnog transportera koji je specifičan za arbuskul, dolazi do preuranjene degradacije arbuskula (Javot i sur. 2007). Taj mehanizam biljci omogućuje da održi efikasne arbuskule, a da one manje efikasne ukloni preuranjenom degradacijom. Na taj način biljka može ukloniti i potencijalno „dobre“ simbiote koji imaju siromašan izvor fosfata. Dolazi do kompeticije između gljivinih hifa za formiranje arbuskula tako da s vremenom hife koje su dobar izvor hranjivih tvari zamijene one manje efikasne. Tako limitirani životni vijek arbuskula uzrokuje konstantno obnavljanje i „prespajanje“ mreže hifa što za posljedicu ima najbolju opskrbu hranjivim tvarima.

4.2. Prijenos hranjivih tvari između biljke i gljive u endotrofnoj mikorizi

Arbuskul se sastoji od razgranatih hifa koje imaju vrlo tanke terminalne vrhove što rezultira većim omjerom površine i volumena nego kod normalnih hifa. Zato su takve hife efikasnije u prijenosu hranjivih tvari, što je cilj uspostavljanja arbuskularne mikorize. Najvažnije tvari koje biljka dobiva od gljive su fosfati i voda, a za uzvrat gljiva dobiva čak oko 20% ugljikohidrata koji su produkt fotosinteze (Bago i sur. 2000).

Aktivan transport mnogih metabolita kroz biološke membrane se dešava paralelno s prijenosom protona u istom ili suprotnom smjeru. Kao posljedica tog mehanizma stvaraju se protonski gradijenti uzduž membrana. Takvi protonski gradijenti postoje i u membranama koje sudjeluju u izmjeni metabolita u endotrofnoj mikorizi. Naime, otkriveno je da je periarbuskularni prostor kiseliji od okolnog dijela arbuskula. Enzimi koji omogućuju takav aktivan transport i spomenuto zakiseljavanje su ATPaze ovisne o H^+ . Utvrđeno je da ti enzimi postoje i na biljnoj i na gljivinoj membrani (Karandashov i Bucher 2005).

4.2.1. Metabolizam ugljika u endotrofnoj mikorizi

Ugljik se u endotrofnoj mikorizi najviše prenosi u obliku ugljikohidrata. Ako promatramo prijenos hranjivih tvari u endotrofnoj mikorizi pojedinačno, možemo reći da je prijenos ugljikohidrata glavna korist koju dobiva gljiva kao simbiotski partner. Gljiva u arbuskularnoj mikorizi je obligatni biotrof. Tome pridonosi činjenica da hife koje su izvan korijena ne mogu crpiti ugljikohidrate iz okoline nego ih dobivaju najvećim dijelom iz hifa koje su u unutrašnjosti biljke (Bago i sur. 2000).

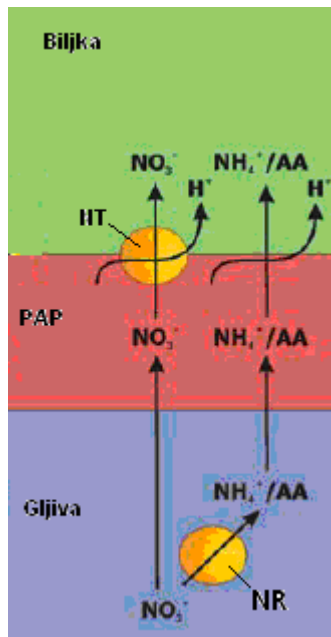
U prijenosu ugljikohidrata iz biljke u gljivu najvjerojatnije sudjeluju biljne i gljivine ATP-aze. ATP-aze se kod gljive ne nalaze samo u području arbuskula, nego i na većini površine hifa koje su unutar biljnih stanica tako da je najvjerojatnije moguć prijenos ugljikohidrata i u tom području (Bago i sur. 2003).

Šećere nastale fotosintezom može koristiti biljka ili se mogu transportirati u periarbuskularni prostor, vjerojatno u obliku saharoze. Ovdje se saharoza cijepa u heksoze (najčešće glukozu i fruktozu) te se transporterima na gljivinoj membrani prenosi u citoplazmu arbuskula. Gljiva ubrzo pretvara heksoze u granule glikogena ili u lipidne kapljice triacilglicerola.. U takvom obliku ugljikohidrati se mogu transportirati na veće udaljenosti sve do hifa koje su izvan korijena biljke (Bago i sur. 2003).

4.2.2. Prijenos dušika u endotrofnoj mikorizi

Dušik je jedan od najvažnijih elemenata za živi organizam, ali unatoč tome, vrlo malo se zna kako se dušik prenosi iz gljive u biljku prilikom arbuskularne mikorize. Gljive koje su u arbuskularnoj mikorizi imaju sposobnost razgradnje dušičnih spojeva iz organskog materijala i brže usvajanje dušika koji se tada može prenijeti u biljku.

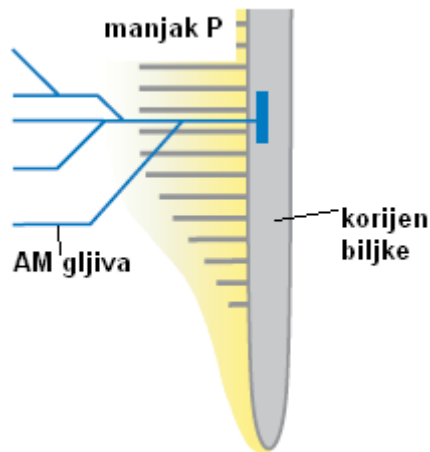
Micelij gljive koji raste izvan korijena biljke dušik uzima iz tla pomoću amonijevih ili nitratnih transportera ili pomoću transportera koji prenosi aminokiseline. Unutar hifa dušik se prenosi u obliku aminokiselina, najčešće arginina. Kada dospije do hifa koje rastu unutar biljne stanice, dušik se otpušta iz arginina u obliku ureje i kao takav se prenese direktno u biljku ili do prijenosa dođe nakon što se pretvori u amonijak (Slika 6.). Dakle, dušik se u biljku prenosi bez ugljika (Hodge i sur. 2001). S obzirom na taj mehanizam, geni za asimilaciju dušika su eksprimirani u hifama koje rastu izvan gljive, a oni koji su odgovorni za raspadanje arginina su eksprimirani u miceliju koji raste unutar biljke.



Slika 6. Prijenos dušika u AM. U korijenu biljke nađeni su nitratni transporteri inducirani arbuskularnom mikorizom. U gljivi je pojačana transkripcija nitrat- reduktaze što znači da se dušik prenosi i u reduciranom obliku. AA- aminokiseline, NR- nitrat- reduktaza, NT- transporter nitrata, PAP- periarbuskularni prostor. (Preuzeto i prilagođeno iz Hause i Fester, 2005).

4.2.3. Prijenos fosfata u endotrofnoj mikorizi

Fosfor je vrlo važan element za sve žive organizme gdje ima mnoge funkcije, npr. potreban je kao važan strukturni element nukleinskih kiselina, fosfolipida i nekih enzima, uključen je u metabolizam energije i dr.. Zato je vrlo važno da fosfor organizmu uvijek bude dostupan. Korijenje biljke brže apsorbira fosfate iz tla nego što fosfat iz tla difundira tako da se oko korijena često stvara zona u kojoj postoji manjak fosfata (Slika 7.). Zato su biljke razvile mehanizme koji im olakšavaju primanje fosfata, a jedan od njih je endotrofna mikoriza. Naime, micelij koji raste izvan korijena biljke raste dalje od zone manjka fosfata pa predstavlja dodatan izvor topivog fosfata (Karandashov i Bucher 2005). Bolji unos fosfata je za biljku u endotrofnoj mikorizi glavna prednost.



Slika 7. U blizini korijena biljke dolazi do manjka fosfata, a gljiva koja uspostavlja AM raste izvan te zone. (Preuzeto i prilagođeno iz Karandashov i Bucher 2005).

Nedavno je otkriveno da biljka može uzimati fosfate iz dva moguća izvora: direktno iz tla preko epiderme korijena i korijenovih dlačica ili iz micelija gljive s kojom je u endotrofnoj mikorizi (Karandashov i Bucher 2005). Najvjerojatnije u ta dva načina unosa fosfata sudjeluju različiti fosfatni transporteri. U slučaju manjka fosfata, geni za fosfatne transportere su ili konstitutivno ili pojačano eksprimirani. Biljka selektivno uzima fosfat iz tla i to suprotno od elektrokemijskog gradijenta i uz strmi koncentracijski gradijent jer je koncentracija fosfata i do 1000 puta veća u stanici korijena u odnosu na mikromolarne koncentracije u tlu. Taj proces zbog toga zahtijeva energiju. Biljka iz tla fosfat uzima pomoću proteina koji su u membrani korijena, a to su transporteri fosfata i ATP-aze ovisne o H^+ .

Prvi korak prijenosa fosfata iz gljive u biljku u endotrofnoj mikorizi je unos fosfata iz tla u gljivu pomoću transportera s velikim afinitetom za fosfat. Apsorbirani fosfat se unutar gljive apsorbira u nukleinske kiseline, fosfolipide i dr.. Zatim se takve molekule transportiraju do micelija koji raste unutar korijena biljke. Ne zna se točno na koji način se fosfat otpušta iz gljive u biljne stanice. Fosfat iz gljive u biljku prelazi niz koncentracijski gradijent, a prijenos preko membrane olakšavaju različiti kanali i pumpe. Oslobođene fosfate biljka iz periarbuskularnog prostora preuzima pomoću vlastitih fosfatnih transportera kao zadnji korak u prijenosu fosfata u endotrofnoj mikorizi. Primijećeno je da je za vrijeme takvog prijenosa fosfata inducirana ekspresija fosfatnih transportera specifičnih za mikorizu, a u nekim slučajevima je istovremeno smanjena ekspresija transportera specifičnih za izravan unos fosfata iz tla u biljku. Većina fosfora se crpi putem mikorize pa možemo zaključiti da transporteri specifični za mikorizu igraju ključnu ulogu u produktivnosti i fitnesu biljaka u većini ekosistema (Karandashov i Bucher 2005).

5. ZAKLJUČAK

Endotrofna mikoriza je vrlo zanimljiv i važan fenomen. Većina kopnenih biljaka uspostavlja AM (čak 70-90%) pa zbog toga ovaj tip mikorize uvelike pridonosi globalnom kruženju fosfata i ugljikohidrata i utječe na produktivnost kopnenih ekosustava. Molekularni mehanizmi koji vode do AM su manje poznati od onih koji upravljaju evolucijski mlađom simbiozom biljke i dušik fiksirajućih bakterija pa se zbog toga u posljednjih nekoliko godina AM intenzivno proučava. Tome svjedoči sve veći broj radova koji se bave ovom problematikom (pogotovo zadnjih desetak godina), kao i veliki broj revijalnih radova koji sumiraju do sada otkrivene činjenice. Otkrivene su signalne molekule (strigolaktini) koje otpušta biljka kao i signali (Myc faktori) koje otpušta gljiva prije nego što kolonizira biljku. Identificirani su geni koji sudjeluju u signalnom putu (SYMRK- kinaza, CASTOR i POLLUX kationski kanali, CCaMK i CYCLOPS) te je ustanovljena važnost oscilacije koncentracije kalcija u uspostavljanju ovog simbiotskog odnosa kao i uloga prepenetracijskog aparata.

Prednost u proučavanju endotrofne mikorize je to što koristi isti signalni put kao i simbioza s dušik fiksirajućim bakterijama. Zato su najzanimljivija istraživanja provedena na leguminozama koje ne mogu uspostaviti niti simbiozu s dušik fiksirajućim bakterijama niti AM. Genetika biljaka će i dalje biti glavni alat u identifikaciji gena koji su potrebni za uspostavljanje AM. Time će se moći preciznije shvatiti događaji u signalnom putu, pogotovo prijenos signala preko SYMRK- kinaze i način interpretacije oscilacija koncentracije kalcija. Biti će vrlo zanimljivo otkriti strukturu Myc faktora, što će omogućiti i identifikaciju njihovih biljnih receptora.

6. LITERATURA

- Akiyama, K., Hayashi, H., 2006. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany* **97**(6), 925-931.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Abubaker, J., Jun, J., Allen, J., Brouillette, J., Douds, D., Shachar-Hill, Y., 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol.* **131**, 1496–1507.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y., 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* **124**, 949–958.
- Besserer, A. Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J., Roux, C., Bécard, G., Séjalon-Delmas, N., 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* **4**, 1239–1247.
- Chen, C., Fan, C., Gao, M., Zhu, H., 2009. Antiquity and Function of CASTOR and POLLUX, the Twin Ion Channel-Encoding Genes Key to the Evolution of Root Symbioses in Plants. *Plant Physiol.* **149**, 306–317.
- Fitter, A. H., 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *J. Ecol.* **93**, 231–243.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., Barker, D.G., 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**, 3489–3499.
- Hause, B., Fester, T., 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* **221**, 184–196.
- Hodge, A., Campbell, C.D., Fitter, A.H., 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**, 297–299.
- Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., Harrison, M. J., 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS USA* **104**, 1720–1725.
- Karandashov, V., Bucher, M., 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *TPS* **10**(1), 22-29.
- Kosuta, S. Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R., Downie, A., Oldroyd, G., 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *PNAS USA* **105**, 9823–9828.

- Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Denarie, J., Barker, D., Becard, G., 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**, 952–962.
- Norihito Kanamori, N., 2006. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *PNAS* **103(2)**, 359–364.
- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, **6(10)**, 763-775.
- Paszkowski, U., 2006. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **172**: 35–46.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H., 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *PNAS* **91**, 11841–11843.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions, *Molecules* **12**, 1290-1306.
- Yano, K. et al., 2008. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *PNAS* **105(51)**, 20540- 20545.
- Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Sekimoto, H. 2007. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasite. *Planta* **225(4)**, 1031-1038.
- Yoshida, S., Parniske, M., 2005. Regulatori mechanisms of SYMRK kinase activity. U: Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment. Wang, Y.- P., 183-185.

7. SAŽETAK

Endotrofna mikoriza je simbioza između gljive i biljke, a pri čemu gljiva raste djelomično i unutar samog korijena biljke. U arbuskularnoj mikorizi (AM) gljive iz reda *Glomeromycota* tvore arbuskule unutar korijena biljke. To su razgranate hife nalik na drvo čija je zadaća prijenos hranjivih tvari između biljke i gljive. Prvenstveno je poboljšán prijenos fosfata i dušika u biljku, a ugljik nastao fotosintezom odlazi u gljivu. Tijekom evolucije, „genetički program“ AM poslužio je kao temelj i za druge simbioze koje uključuju korijen biljke pa tako dušik fiksirajuće bakterije koriste isti signalni put kao i AM. Međutim, molekularni mehanizmi koji vode do AM manje su poznati od onih koji dovode do simbioze biljke i dušik fiksirajuće bakterije pa se u zadnjih nekoliko godina endotrofna mikoriza intenzivno istražuje. Zahvaljujući tome otkriveni su strigolaktin- signalne molekule koje otpušta biljka i koje potiču hife gljive na grananje u smjeru biljke. Otkriveni su i signali (Myc faktori) koje otpušta gljiva prije nego što kolonizira biljku, iako još nije poznat točan sastav kao ni biljni receptori za koje se vežu. Ustanovljeno je da u uspješnoj kolonizaciji korijena aktivno sudjeluje i sama biljka pripremajući intracelularni okoliš za hife gljiva stvarajući prepenetracijski aparat (PPA). Također su identificirani i bitni geni koji sudjeluju u signalnom putu (SYM): SYMRK- kinaza, CASTOR i POLLUX kationski kanali, CCaMK i CYCLOPS. Otkriveno je i da oscilacija koncentracije kalcija imaju bitnu ulogu u uspostavljanju ovog simbiotskog odnosa.

8. SUMMARY

Endotrophic mycorrhiza is symbiosis between fungi and plant in which fungi grow partly in the plant root. In arbuscular mycorrhiza, fungi from the genus *Glomeromycota* form arbuscules inside the plant root. These are treelike hyphae which role is nutrients exchange between fungi and plant. Primarily, phosphorus and nitrogen transfer to the plant is improved and photosynthetic driven carbon is transferred to the fungi. During evolution, AM „genetic program“ was the basis for other symbioses including plant root and that's the reason why nitrogen fixing bacteria utilize the same signalling pathway. However, molecular mechanisms that lead to AM are less known than those that lead to symbiosis with nitrogen fixing bacteria, so in past few years endotrophic mycorrhiza is being intensively investigated. Due to this fact, strigolactones, plant driven signal molecules inducing hyphal branching, have been discovered. Hypha driven preinfection signals (Myc factors) are discovered too, although their identity and plant receptors are not yet being defined. The plant participates actively in successful root colonization by creating prepenetration apparatus (PPA). Also, important SYM genes involved in signalling pathway have been identified: SYMRK kinase, CASTOR and POLLUX cation channels, CCaMK and CYCLOPS. It has been discovered that oscillations in calcium concentration plays an important role in establishment of this symbiotic relationship.