

Katarzyna Kucharska^{1*}, Urszula Wachowska¹

¹Katedra Fitopatologii i Entomologii, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie
ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn

Wpłynęło w grudniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Liść jako siedlisko mikroorganizmów. 3. Społeczności mikroorganizmów na liściach. 4. Mikrobiom. 5. Pozytywne oddziaływanie mikroorganizmów na rośliny. 6. Negatywne oddziaływanie mikroorganizmów na rośliny. 7. Struktura zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście. 8. Techniki badawcze zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście. 9. Podsumowanie

The Microbiome on the Leaves of Crop Plants

Abstract: The leaves of crop plants are colonized by numerous microorganisms which live on leaf surface or penetrate into the tissues, despite nutrient deficiencies and exposure to adverse environmental conditions. Leaf-colonizing microorganisms exhibit a broad range of relationships with the host plant, thus forming a complex interactive ecosystem. The functions of microbial communities and their effects on the host plant have not been fully elucidated to date. Expanding our knowledge in this area can have important practical implications, including more effective pathogen and disease control. Rapidly developing molecular techniques can provide valuable information about the interactions between microbes and the host plants they colonize. The aim of this study was to characterize microorganisms colonizing the leaves of crop plants, and to discuss the benefits and threats related to their presence in this ecological niche.

1. Introduction. 2. Leaf as habitation of microorganisms. 3. Community of microorganisms on the leaves. 4. The microbiome. 5. Positive interaction of microorganisms on plants. 6. Negative interaction of microorganisms on plants. 7. Structure of microorganism communities colonizing leaves. 8. Techniques of study microorganism communities colonizing leaves. 9. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, liście, mikroorganizmy, rośliny uprawne

Key words: crop plants, biofilm, leaves, microorganisms

1. Wstęp

Rośliny kolonizowane są przez mikroorganizmy na całej swojej powierzchni, na liściach, korzeniach, nasionach oraz międzykomórkowo i wewnątrzkomórkowo w tkankach i w wiązkach przewodzących. Każde z tych miejsc charakteryzuje się innymi warunkami i innymi wydzielinami będącymi dla wybranych mikroorganizmów źródłem substancji odżywczych albo czynnikiem hamującym ich rozwój [67].

Fyllosfera, czyli cała nadziemna część rośliny [30] jest siedliskiem bytowania mikroorganizmów o bardzo niekorzystnych dla ich rozwoju warunkach. Zbiorowiska drobnoustrojów zasiedlających liście charakteryzują się dużym zróżnicowaniem zwłaszcza pod względem liczebności. Najwięcej jest tu bakterii, ich liczbę oszacowano na 10^6 – 10^8 komórek na centymetr kwadratowy. Na liściach pojawiają się również drożdże, grzyby strzępkowe, rzadziej glony, algi i nicienie [6, 30, 67]. Fyllosfera wraz z zasiedlającymi ją organizmami ma duże znaczenie środowiskowe i rolnicze [68], głównie ze względu na wpływ mikroorganizmów na zdrowotność i plonowanie roślin [69].

Skład gatunkowy mikroorganizmów fyllosfery selekcyjony jest w dużej mierze przez warunki atmosferyczne, takie jak opady deszczu czy silne podmuchy

wiatru [6]. Czynnikiem różnicującym skład jakościowy fyllosfery jest również gatunek rośliny oraz sposób jej uprawy i ochrony, głównie stosowane środki ochrony roślin oraz nawożenie [6, 15, 17, 30, 73].

2. Liść jako siedlisko mikroorganizmów

Liście rośliny pokryte są skórka, zwaną epidermą, która jest cienką barierą pomiędzy tkankami rośliny a środowiskiem zewnętrznym [25, 61]. W obrębie epidermy naprzemiennie występują wyspecjalizowane komórki i struktury wielokomórkowe spełniające szereg istotnych funkcji [30]. Ich głównym zadaniem jest ochrona rośliny, zarówno przed stratami wody czy substancji odżywczych jak i przed patogenami [25, 61]. Dlatego zewnętrzne ściany komórkowe epidermy są grubsze. Dodatkowo na ich powierzchni tworzy się warstwa ochronna zwana kutykulą. Zbudowana jest ona z polisacharydów, polimerów kwasów tłuszczowych (kutyny) oraz wosku [60]. Epiderma roślin może znacząco różnić się budową. W przypadku pszenicy oźmiej zbudowana jest z pojedynczej warstwy komórek, pokrytej kutykulą i woskiem o złożonej strukturze: warstwowej, płytkowej oraz krystalicznej. Na powierzchni liści występują włoski o zróżnicowanej budowie

* Autor korespondencyjny: Katedra Fitopatologii i Entomologii, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn; tel: (89) 523 41 59; E-mail: katarzyna.kurek@uwm.edu.pl

w zależności od odmiany i gatunku rośliny oraz strony blaszki liściowej [60, 65].

Powierzchnia liści jest środowiskiem o niekorzystnych warunkach do rozwoju mikroorganizmów. Jest to spowodowane głównie małą dostępnością substancji odżywczych oraz ekspozycją na zmiany temperatury i wilgotności [30, 44]. Mimo to jest ona bezustannie narażona na inwazję mikroorganizmów i stanowi istotne siedlisko ich bytowania [30]. Duże znaczenie dla mikroorganizmów zasiedlających liście mają opady deszczu. Obfite opady mogą część drobnoustrojów zmyć z powierzchni roślin, przez co tworzy się wolna nisza ekologiczna dla innych gatunków [6]. Na zasiedlanie liści przez epifity ma wpływ również jego topografia modyfikująca temperaturę czy prędkość wiatru na jego powierzchni [33].

Pierwszym miejscem styku drobnoustrojów z rośliną jest kutykula i wosk posiadające wodoodporne właściwości utrudniające zasiedlenie liści, zwłaszcza młodych roślin, których kutykula jest nienaruszona [53]. W późniejszych etapach rozwoju kutykula ulega uszkodzeniom, między innymi spowodowanych działalnością drobnoustrojów wnikających do tkanek rośliny i niszczących kutykulę wraz z komórkami epidermy [61].

Ponieważ powierzchnia liści jest uboga w substancje odżywcze tylko niewielki procent mikroorganizmów trafi na miejsce i czas dogodnych warunków do rozwoju [6, 30]. Największym ograniczeniem wzrostu mikroorganizmów na powierzchni liści jest niewielka i nierównomiernie rozmieszczona dostępność substancji odżywczych. Największym ich źródłem są rany, którym towarzyszą znaczne wycieki substancji odżywczych wraz z substancjami hamującymi wzrost patogenów wydzielanymi przez rośliny jako reakcje ochronne. Dogodnymi miejscami do czerpania związków takich jak cukry, najczęściej sacharozy, glukozy, fruktozy są zagłębienia wzdłuż wiązek przewodzących oraz miejsca wyrastania włosków epidermy [6]. Dostępność azotu i żelaza nie jest uważana za tak ograniczający czynnik jak dostępność węgla [30].

Dostępność substancji odżywczych jest zróżnicowana nie tylko w różnych miejscach ale i w czasie. W okresie wzmożonej aktywności fizjologicznej na powierzchni liści zaobserwowano bierne wycieki takich substancji jak cukry, aminokwasy, kwasy organiczne, substancje lotne i inne. Wycieki substancji organicznych mogą być również wywołane przez mikroorganizmy. Niektóre drobnoustroje potrafią syntetyzować i uwalniać regulatory wzrostu roślin, dzięki którym pobudzają roślinę do uwalniania składników pokarmowych [6, 69]. Inne mają zdolność wytwarzania surfaktantów, które zmniejszają napięcie powierzchniowe na powierzchni liścia przez co ułatwiają dostępność wody oraz dyfuzję i rozpuszczalność substancji odżywczych [39]. Różne gatunki mikroorganizmów mogą wytwa-

rzać różne surfaktanty: lipopeptydy, lipoproteiny, glikolipidy, fosfolipidy oraz polimeryczne surfaktanty [12]. Najczęściej spotykane są lipopeptydy produkowane przez *Bacillus subtilis* oraz glikolimidy produkowane przez rodzaj *Pseudomonas* [45].

3. Społeczności mikroorganizmów na liściach

Źródeł drobnoustrojów na liściach może być wiele, mogą one dostawać się za pośrednictwem deszczu, wiatru czy z nasion lub z gleby za pośrednictwem wiązek przewodzących. Mogą one również być przenoszone przez owady i zwierzęta. Zarodniki grzybów patogenicznych, komórki drożdży czy bakterii powszechnie występują na liściach zdrowych roślin [6]. Duże znaczenie w interakcjach między drobnoustrojami na powierzchni liści ma konkurencja o pokarm, która w znacznym stopniu różnicuje skład gatunkowy mikroorganizmów. Jest to zjawisko silnie uzależnione od kolejności pojawiania się drobnoustrojów na powierzchni liści [30].

Niektóre z mikroorganizmów dostających się na powierzchnię liści mają zdolność do wnikania w żywe tkanki rośliny, gdzie jest łatwiejszy dostęp do substancji odżywczych oraz mniejsza ingerencja warunków atmosferycznych. Mikroorganizmy bytujące na powierzchni liścia nazywamy epifitami, i w naturze według niektórych autorów jest ich więcej niż mikroorganizmów nie patogenicznych żyjących w żywych tkankach roślin czyli endofitów [6, 30].

Epifity jako mikroorganizmy żyjące na powierzchni roślin wykształcają odpowiednie cechy by przystosować się do ubogiego w substancje odżywcze środowiska. Uodparniają się na szereg niekorzystnych zjawisk, jak wcześniej wspomniane zmywanie przez opady deszczu czy niekorzystny wpływ promieniowanie UV [6, 38]. Niektóre bakterie i grzyby chronią się przed szkodliwym promieniowaniem poprzez odpowiednie zabarwienie. Ciemna barwa strzępek chroni grzyby rodzaju *Cladosporium* i *Aureobasidium*. Natomiast grzyby rodzaju *Fusarium* przystosowały się do bytowania w niekorzystnych warunkach wytwarzając chlamydosporę [58].

Endofity do tkanek roślinnych mogą dostawać się różnymi drogami, poprzez naturalne otwory takie jak na przykład pory aparatu szparkowego oraz rany i uszkodzenia. Mogą one kolonizować zarówno wnętrza komórek (np. epidermy) jak i przestrzenie międzykomórkowe [63]. Istotną barierę na powierzchni liści dla nich tworzy kutykula [6]. Dlatego też endofity mogą wnikać do rośliny przez system korzeniowy, a następnie przez wiązki przewodzące przemieszczać się do nadziemnych partii rośliny [35].

Obecnie przyjmuje się, że mikroorganizmy występują na powierzchni liści w agregatach lub wielokomórkowych

społecznościach biofilmu. Wielokomórkowe społeczności mikroorganizmów często zanurzone są w bezpostaciowych polimerach związków organicznych a mechanizmem regulacji ekspresji genów zależnym od zagęszczenia komórek drobnoustrojów w biofilmie jest sygnalizator zagęszczenia (*quorum sensing*, QS). Związane z roślinami bakterie i grzyby często wykorzystują sygnalizator zagęszczenia do modulowania i koordynowania interakcji z roślinami. Obejmuje on kontrolę takich procesów jak maceracja tkanki roślinnej (produkcja enzymów), replikacja DNA, a także sporulacja i różnicowanie komórek [3]. Często sygnały te są niezbędne aby uruchomić horyzontalny transfer genów, produkcję czynników patogeniczności, antybiotyków lub innych wtórnych metabolitów [21, 54]. W przypadku dimorficznych grzybów autoinduktory wpływają na tworzenie strzępek lub komórek pączkujących. W opisywanym mechanizmie najważniejszą rolę odgrywają niskocząsteczkowe związki sygnałowe zwane cząsteczkami sygnalizacyjnymi (autoinduktory), które wydzielane są na zasadzie dyfuzji przez błonę komórkową lub w drodze aktywnego transportu z cytoplazmy do wnętrza struktury biofilmu [3, 27]. Autoinduktory są na ogół specyficzne dla gatunku lub szczepu i charakteryzują się dużą strukturalną różnorodnością u różnych mikroorganizmów [27].

4. Mikrobiom

Podstawowe interakcje między mikroorganizmami a roślinami jakie można zaobserwować na liściach to pasożytnictwo oraz komensalizm. Bardzo rzadko w tym środowisku występują zależności troficzne [38]. Między mikroorganizmami zasiedlającymi liście a rośliną istnieje sieć powiązań pozwalająca przesyłać sygnały, dzięki czemu porozumiewają się one między sobą oraz z gospodarzem. Wiadomo że tkanki roślin zasiedlane są przez wiele gatunków mikroorganizmów, które na siebie wzajemnie wpływają w ramach zjawiska *quorum-sensing* za pomocą małych cząstek sygnałowych lub innych elicitorów [54]. Sprawia to, że mikroorganizmy wraz z komórkami gospodarza tworzą kompleksowy interaktywny ekosystem decydujący o wielu różnych procesach biologicznych, w tym również o zdrowotności rośliny [63]. Fakt ten pozwala na nazwanie tej niszy ekologicznej – mikrobiomem. Pojęcie to zaproponowane zostało przez Joshua Lederberga w 2001 roku dla określenia całości ekologicznego środowiska złożonego z drobnoustrojów komensalicznych, symbiotycznych i chorobotwórczych [7, 43].

Interakcje pomiędzy endofitami a ich gospodarzami są bardzo złożone i nie do końca poznane. Mikroorganizmy poprawiają żywotność roślin w zmianach dostępu do substancji odżywczych oraz schronienie.

Na zapoczątkowanie współistnienia ma wpływ wiele czynników takich jak warunki środowiskowe (zarówno biotyczne jak i abiotyczne) oraz cechy fenotypowe i genotypowe rośliny i mikroorganizmów [72]. Niepatogeniczne kolonizowanie tkanek roślin przez endofity jest możliwe również dzięki zachowaniu równowagi w interakcjach pomiędzy rośliną a mikroorganizmami. Większość endofitów posiada cechę patogeniczności w stosunku do gospodarza, która powinna zostać utrzymana w równowadze z mechanizmami obronnymi rośliny. W sytuacji gdy roślina całkowicie zwalcza wirulencję endofitu, mikroorganizm ginie. Natomiast gdy mechanizmy obronne rośliny są zbyt słabe, pojawiają się objawy chorobowe prowadzące do wyniszczenia rośliny. Proces ten jest bardzo wrażliwy na zmiany w początkowych fazach, kiedy to dużą rolę odgrywają czynniki środowiskowe. Wiadomo jednak, że wiele endofitów w późniejszych fazach po wnikięciu do tkanki roślinnej pozostaje w formie utajonych patogenów, a ich wirulencja może zostać aktywowana przez czynniki wewnętrzne lub zewnętrzne [51]. Udowodniono zostało, że interakcje endofit – roślina nie są wyłącznie uzależnione od równowagi między nimi, ale również od szeregu innych bardziej skomplikowanych związków [26].

5. Pozytywne oddziaływanie mikroorganizmów na rośliny

Zasiedlenie powierzchni liści przez komórki czy zarodniki jest uzależnione od wielu czynników w tym w dużej mierze od oddziaływań liść – środowisko [13] oraz fizycznych i genetycznych właściwości rośliny i mikroorganizmów [6, 38]. Udowodniono jest, że część z nich ma istotny wpływ na rośliny [6, 68]. Często oddziaływanie to pozytywnie wpływa na rozwój roślin uprawnych. Przykładem pozytywnych oddziaływań może być wiązanie azotu, poprawa produktywności upraw, ograniczenie infekcji przez mikroorganizmy patogeniczne lub też degradacja niektórych zanieczyszczeń organicznych [6]. Interakcje pomiędzy epifitami a roślinami niezaprzeczalnie istnieją. W badaniach na pszenicy ozimej zaobserwowano, że duża liczebność bakterii podnosi plonowanie oraz ogranicza nasilenie objawów septorioz [65].

Oddziaływanie epifitycznych drożdży na roślinę jest zróżnicowane. Mogą one wpływać hamująco na rozwój patogenów poprzez indukowanie w tkankach roślin mechanizmów obronnych. Na przykład grzyby należące do rodzaju *Cryptococcus* i *Rhodotorula*, które w siewkach mogą wzbudzać syntezę amoniakaliazy fenyloalaniny (PAL) oraz białek biorących czynny udział w tworzeniu się czynnej odporności pszenicy [10]. Natomiast białe kolonie grzyba rodzaju

Sporobolomyces ograniczają intensywność objawów septorioz, prawdopodobnie na drodze konkurencji o przestrzeń i substancje organiczne z patogenem, w przeciwieństwie do *S. roseus* któremu towarzyszy wzrost nasilenia objawów wywołanych przez patogeny rodzaju *Septoria* [20].

Interakcje pomiędzy endofitami a ich gospodarzami są bardzo złożone i nie do końca poznane. Endofity mogą wchodzić z rośliną w symbiozę bądź mutualizm. W tkankach roślin znaleźć można najczęściej grzyby i bakterie, rzadziej występują tu mikoplazmy i archeobakterie [63]. Te ostatnie na ogół umiejscawiają się we wnętrzu komórki roślinnej. Mikroorganizmy endofityczne mogą pozytywnie oddziaływać na zdrowotność rośliny poprzez podnoszenie tolerancji na stropy biotyczne i abiotyczne, zwiększanie produkcji biomasy czy zmniejszanie zapotrzebowania na wodę [51, 71]. Grzyby endofityczne zasiedlające tkanki roślinne mają zdolność produkcji różnorodnych związków, między innymi alkaloidów, peptydów, steroidów, terpenoidów, fenoli i chinin, które ograniczają zasiedlanie rośliny przez patogeny oraz zgryzanie przez roślinożerców. Mogą one również stymulować wzrost i rozwój roślin poprzez produkcję fitohormonów. Wśród endofitów zaobserwowano drobnoustroje wiążące wolny azot, dzięki czemu mogą zaopatrywać przynajmniej częściowo roślinę w ten pierwiastek i podnosić jej plonowanie [2, 31, 32, 50, 59]. Mają one również zdolność przetwarzania niektórych substancji organicznych w substancje przyswajalne zarówno dla roślin jak i mikroorganizmów [47, 57].

6. Negatywne oddziaływanie mikroorganizmów na rośliny

Mikroorganizmy zasiedlające powierzchnię i tkanki liści mogą negatywnie wpływać na rozwój roślin uprawnych. Jako oddziaływania negatywne rozumie się na ogół patogeniczność drobnoustrojów dla roślin, co prowadzi do zniszczenia tkanki liści, ograniczenia plonu i pogorszenia jego jakości [40]. W takich przypadkach inhibitorem wzrostu patogenicznych mikroorganizmów są nie tylko warunki środowiskowe ale i sam gospodarz. Roślina broni się przed infekcją patogenów wydzielając wtórne metabolity takie jak peptydy czy proteiny [9, 55]. Wydzielane są one na powierzchnię liści za pomocą włosków zwanych trichomami [29]. Liście wydzielają również szereg substancji lotnych, takich jak nieznaczne ilości CO₂, aceton, terpenoidy, aldehydy, alkohole, węglowodory, siarczki, związki azotowe, które mają selektywne działanie inhibicyjne w stosunku do patogenów [37].

Mechanizmy obronne roślin nie zawsze efektywnie ograniczają rozwój patogenicznych grzybów strzępkow-

wych. Ta grupa mikroorganizmów, odmiennie niż drożdże i większość bakterii, ma negatywny wpływ na pszenicę ozimą. W nielicznych przypadkach powodować mogą indukcję odporności (niektóre grzyby rodzaju *Cladosporium*), jednak gatunki takie jak *Cladosporium herbarum* czy *C. cladosporioides* mogą powodować czernienie kłosów i przyspieszać starzenie się liści, co ściśle wiąże się ze spadkiem plonów. Dodatkowo ich zarodniki są silnymi alergenami. Większość gatunków saprotroficznych grzybów strzępkowych również nie wykazuje zdolności do ograniczania rozwoju patogenów roślin [8]. Dlatego liście każdej rośliny uprawnej infekowane są przez co najmniej kilka nekrotroficznych lub biotroficznych patogenów.

Na liściach roślin uprawnych mogą występować również bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Erwinia* i *Xanthomonas*, u których w komórkach tworzą się zaczątki lodu w temperaturze nieznacznie wyższej niż zero, co skutkuje powstawaniem na roślinie uszkodzeń mrozowych [65]. Gatunki takie jak *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* żyją jako nieszkodliwe epifity, ale tylko dopóki mają wystarczającą ilość substancji odżywczych. Gdy zaczyna im brakować pokarmu, wnikają do tkanek rośliny niszcząc je [30].

7. Struktura zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście

Zbiorowiska mikroorganizmów epifitycznych są silnie zróżnicowane pod względem liczebności, jednak ich urozmaicenie gatunkowe jest niewielkie w porównaniu ze zbiorowiskami pochodzącymi z ryzosfery. Najczęściej występują tu bakterie i drożdże, rzadziej grzyby strzępkowe, sporadycznie patogeny. W okresie wegetacyjnym rośliny mikroorganizmy na liściach rozwijają się z różną dynamiką. W początkowych fazach rozwoju roślin na liściach najliczniej występują bakterie, zastępowane przez drożdże i grzyby strzępkowe w późniejszych fazach rozwojowych [6]. Na powierzchni liści roślin uprawnych zidentyfikowano liczne gatunki mikroorganizmów wymienione w tabeli I. Zróżnicowanie gatunkowe bakterii zasiedlających tkanki liści jest zdecydowanie mniejsze, zidentyfikowano tu bakterie rodzajów *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Brevundimonas*, *Rheinheimera* (Tabela II). Drożdże, według niektórych autorów, są najliczniejsze w grupie epifitów (Tabela I). Z liści najczęściej wyosobniane są jako białe, kremowe bądź czerwone, drobne kolonie. Dominują tu grzyby rodzaju *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* i *Cryptococcus* [16]. Zbiorowiska epifitycznych grzybów strzępkowych zasiedlających liście są ubogie i słabo urozmaicone (Tabela I, II). Ich liczebność wzrasta wraz z wiekiem roślin. Gatunki patogeniczne rodzaju *Fusarium*, *Septoria*, *Stagonospora*, *Phoma* i *Alternaria*

Tabela I

Epifityczne mikroorganizmy zasiedlające liście roślinach uprawnych

Gatunek bakterii	Roślina uprawna	Źródło	Gatunek grzyba	Roślina uprawna	Źródło
<i>Actinetobacter</i> sp.	pieprz	[73]	<i>Aureobasidium pullulans</i>	winorośli	[19]
<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	pieprz	[73]	<i>Candida</i> sp.	pszenica	[5]
<i>Bacillus</i> sp.	winorośl	[19]	<i>Cryptococcus</i> sp.	brak danych	[67]
	pszenica	[42]		pszenica	[42]
<i>Buchnera</i> sp.	pszenica	[17]		pszenica	[11]
<i>Chryseobacterium</i> sp.	winorośl	[19]		pszenica	[41]
<i>Clostridium</i> sp.	pieprz	[73]	<i>Pichia</i> sp.	pszenica	[5]
<i>Enterococcus</i> sp.	pszenica	[4]	<i>Rhodotorula</i> sp.	brak danych	[67]
<i>Enterococcus faecalis</i>	pieprz	[73]		pszenica	[41]
<i>Erwinia</i> sp.	pszenica	[17]	<i>Rhodotorula rubra</i>	pszenica	[42]
<i>Frigoribacterium</i> sp.	winorośl	[19]	<i>Sporobolomyces</i> sp.	brak danych	[67]
<i>Lactobacillus brevis</i>	pszenica	[4]	<i>Acermonium</i> sp.	brak danych	[67]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	pszenica	[4]	<i>Alternaria</i> sp.	brak danych	[67]
<i>Methylobacteria</i> sp.	ryż	[1]	<i>Alternaria alternata</i>	pszenica	[42]
	soja	[1]	<i>Aspergillus</i> sp.	brak danych	[67]
<i>Micrococcus</i> sp.	winorośl	[19]		pszenica	[42]
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	pieprz	[73]	<i>Chaetomium globosum</i>	pszenica	[42]
<i>Pantoea agglomerans</i>	pszenica	[17]	<i>Cladosporium</i> sp.	brak danych	[67]
	winorośl	[19]	<i>Fusarium</i> sp.	pszenica	[42]
<i>Pantoea dispersa</i>	pieprz	[73]	<i>Nigrospora sphaerica</i>	pszenica	[42]
<i>Pseudomonas</i> sp.	pszenica	[17]	<i>Mucor</i> sp.	brak danych	[67]
	pieprz	[73]	<i>Penicillium</i> sp.	brak danych	[67]
	winorośl	[19]	<i>Penicillium lilacinum</i>	pszenica	[42]

Tabela II

Endofityczne mikroorganizmy zasiedlające liście roślin uprawnych

Bakterie	Roślina uprawna	Źródło	Grzyby	Roślina uprawna	Źródło
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	ryż	[46]	<i>Alternaria alternata</i>	pszenica, proso	[24, 28]
		[70]	<i>Ampelomyces</i> sp.	proso	[24]
	pszenica	[52]	<i>Arthrimum</i> sp.	pszenica	[28]
<i>Enterobacter dissolvens</i>	ryż	[46]	<i>Aspergillus</i> sp.	pszenica, proso	[24, 28]
		[70]	<i>Bipolaris</i> sp.	pszenica	[28]
	pszenica	[52]	<i>Chaetomium globosum</i>	pszenica	[28]
<i>Enterobacteraceae bacterium</i>	ryż	[46]	<i>Cladosporium</i> sp.	proso	[24]
		[70]	<i>Fusarium</i> sp.	pszenica, proso	[24, 28]
	pszenica	[52]	<i>Penicillium</i> sp.	pszenica	[28]
<i>Pantoea agglomerans</i>	ryż	[46]	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> , <i>Xylaria</i> sp.	proso	[24]
		[70]	<i>Phoma</i> sp.	pszenica, proso	[24, 28]
	pszenica	[52]	<i>Phomopsis</i> sp.	pszenica, proso	[24, 28]
<i>Pseudomonas</i> spp.	ryż	[46]	<i>Pleospora herbarum</i> , <i>Stemphylium</i> sp.	pszenica	[28]
		[70]	<i>Preussia</i> sp., <i>Septoria</i> sp., <i>Stagonospora</i> sp.	proso	[24]
	pszenica	[52]	<i>Aureobasidium pullulans</i>	winorośl	[36]
<i>Rheinheimera</i> sp.	ryż	[70]	<i>Candida</i> sp., <i>Schizosaccharomyces</i> sp.	proso	[24]
	pszenica	[52]	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Rhodotorulla rubra</i>	pszenica	[28]

częściej uzyskiwane są z tkanki liści niż z ich powierzchni, ale ich liczebność na ogół jest mała.

Endofity to bardzo słabo poznana grupa mikroorganizmów, które kolonizują żywe tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych [26]. Często mają one uproszczony cykl życiowy, co jest wynikiem odizolowania od środowiska zewnętrznego [27]. Mają one duży wpływ na naturalny ekosystem roślin i roślinę [22, 59]. Endofity są mikroorganizmami specyficznymi dla poszczególnych roślin. Często mogą one zasiedlać tkanki więcej niż jednego gatunku roślini jednak w różnym układzie procentowym w stosunku do innych mikroorganizmów [49, 56, 66].

8. Techniki badawcze zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście

Wiedza na temat różnorodności mikroorganizmów w badaniach środowiskowych długo była ograniczona przez metody oparte na hodowli mikroorganizmów. Podobnie tradycyjna taksonomia była prowadzona w oparciu o analizy morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne. Jednak fenotypowa charakterystyka okazała się niewystarczająca dla identyfikacji mikroorganizmów poza poziomem gatunkowym [64]. Spowodowało to intensywny rozwój technik molekularnych w badaniach środowiskowych. W związku z tym rozwijane są również techniki ekstrakcji kwasów nukleinowych bezpośrednio z próbek środowiskowych. Techniki molekularne opierają się głównie o amplifikacji fragmentów DNA, hybrydyzację DNA-DNA i mRNA-DNA, klonowanie DNA, sekwencjonowanie i inne oparte na metodzie PCR (*polimerase chain reaction*) jak RISA (*ribosomal intergenic spacer analysis*) i ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*) [18, 62].

Początkowo w badaniach ekologicznych metody molekularne oparte były o klonowanie fragmentów genów wyizolowanych z próbek środowiskowych. Przyniosło to rewolucję w taksonomii i różnicowaniu populacji mikroorganizmów [34]. Mimo że sekwencjonowanie stało się rutyną, to pod wieloma względami jest nieefektywne oraz może prowadzić do przeszacowania bogactwa gatunkowego [48]. W konsekwencji rozwinięło się wiele innych technik badawczych stosowanych do analiz populacji mikroorganizmów. W badaniach tych DNA jest izolowane bezpośrednio z próbek środowiskowych, a odpowiednie jego fragmenty (16S, 18S, ITS) są amplifikowane z wykorzystaniem uniwersalnych lub specyficznych starterów, a produkty reakcji są rozdzielane w różny sposób [14].

Badania z zakresu różnorodności mikroorganizmów w środowisku, w tym i na powierzchni liści roślin uprawnych są ważne nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z powodu zrozumienia powiązań

między różnorodnością a funkcją i strukturą populacji. Wiedza w tym zakresie jest ograniczona z powodu barier taksonomicznych i metodycznych. Pomimo że metody badań są systematycznie doskonalone, to wciąż nie jest jasne powiązanie różnorodności mikroorganizmów z ich funkcją [23].

9. Podsumowanie

Liście roślin uprawnych zasiedlane są przez liczne mikroorganizmy zwane epifitami i endofitami. Zbiorowiska drobnoustrojów związane z tą niszą ekologiczną są słabo urozmaicone gatunkowo w porównaniu z zespołami mikroorganizmów bytującymi w innych środowiskach. Najczęściej pojawiają się tu bakterie, następnie drożdże i grzyby strzępkowe, a ich liczebność zależna jest między innymi od fazy rozwoju rośliny i warunków atmosferycznych. Mikroorganizmy występują na liściach w postaci agregatów lub biofilmu, który zabezpiecza je przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Mogą one pozytywnie oddziaływać na rozwój roślin uprawnych wiążąc azot atmosferyczny, ograniczając infekcje przez mikroorganizmy patogeniczne lub degradując zanieczyszczenia organiczne. Jednak w warunkach zachwiania subtelnej równowagi między mikroorganizmami i roślinami w tkankach liści rozwijają się patogeny ograniczające powierzchnię asymilacyjną czego konsekwencją są spadki plonu roślin. Mikrobiom liści rośliny kryje w sobie jeszcze wiele tajemnic dotyczących głównie interakcji między mikroorganizmami i roślinami. Dzięki rozwijającym się technikom molekularnym coraz precyzyjniej można określać różnorodność mikroorganizmów i ich funkcje w obrębie liści roślin uprawnych.

Piśmiennictwo

1. Atamna-Ismaeel N., Finkel O., Glaser F., von Mering C., Vorholt J., Koblížek M., Belkin S., Béjà O.: Bacterial anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**, 1–7 (2012)
2. Aly A.H., Debbab A., Kjer J., Proksch P.: Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.* **41**, 1–16 (2010)
3. Baranowska K., Rodziewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos*, **57**, 29–38 (2008)
4. Barbu V.: Phenotypical characterization of several lactic acid bacteria strains isolated from wheat's epiphyte microbiota. *Roum. Biotechnol. Lett.* **13**, 4074–4085 (2008)
5. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D.: Yeasts: Characteristics and identification. *Mycopathologia*, **149**, 159–160 (2000)
6. Bending G.D., Hand P., Pink D., Whipps J.M.: Phyllosphere microbiology with species reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1744–1755 (2008)
7. Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)

8. Blaszkowski J.: 1995.: Biotic effects of mycoflora of leaves, glumes and seeds on *Septoria nodorum* following *Triticum aestivum* treatment with fungicides. *Acta Mycol.* **30**, 223–232 (1995)
9. Chischolm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J.: Host-microbe interactions: shaping the evolution of the olant immune response. *Cell.* **124**, 803–814 (2006)
10. Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., Porat R.: Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopotology*, **92**, 393–399 (2002)
11. Druvefors U., Schnuerer J.: Mold-inhibitory activity of differend yeasts species during airtight storage of wheat grain. *FEMS Yeast Res.* **5**, 373–378 (2005)
12. Fathabad E.G.: 2011.: Biosurfactants I in pharmaceutical industry. *Am. J. Drug Discov. Dev.* **1**, 58–69 (2011)
13. Fierer N., Nemergut D., Knight R., Craine J.M.: Changes through time: integration microorganisms into the study of succession. *Res. Microbiol.* **161**, 635–642 (2010)
14. Frąć M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
15. Ge Y., Zhang J.B., Zhang L.M., Yang M., He J.Z.: Long-term fertilization regimes and diversity of an agricultural affect bacterial community structure soil in northern China. *J. Soil. Sediment.* **8**, 43–50 (2008)
16. Glushakova A.M., Chernov I.Y.: Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella*. *Microbiology*, **73**, 184–188 (2004)
17. Gu L., Bai Z., Jin B., Hu Q., Wang H., Zhuang G., Zhang H.: Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *J. Environ. Sci.* **22**, 134–141 (2010)
18. Gupta V.V.S.R. Dick R.P., Coleman D.C.: Functional microbial ecology: Molecular approaches to microbial ecology and microbial habits. *Soil. Biol. Biochem.* **40**, 1269–1271 (2008)
19. Grube M., Schmid F., Berg G.: Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biol.* **115**, 978–986 (2011)
20. Hodgson V.J., McLeod A.H., Walker G.M.: Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 213–222 (1995)
21. Hughes D.T., Sperandio V.: Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 111–120 (2008)
22. Hyde K.D., Soyong K.: The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.* **33**, 163–173 (2008)
23. Krik J.L., Beaudett L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Method.* **58**, 169–188 (2004)
24. Kleczewski N.M., Bauer J.T., Bever J.D., Clay K., Reynolds H.L.: A survey of endophytic fungi of switchgrass (*Panicum virgatum*) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. *Fungi Ecol.* **5**, 521–529 (2012)
25. Koch K., Bhushan B., Barhlot W.: Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for bionimetics. *Prog. Mater. Sci.* **54**, 137–178 (2009)
26. Kusari S., Spitteller M.: Camptothecin: recent advances in plant endophyte research (w) Natural Resources Conservation and Management, red. L.R. Patro, Manglam Publications, New Delhi, India, 2012, s. 1–32.
27. Kusari S., Hertweck C., Spitteller M.: Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chem. Biol.* **19**, 792–798 (2012)
28. Larran S., Perelló A., Simón M.R., Moreno V.: Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World J. Microb. Biot.* **18**, 683–686 (2002)
29. Lin Y., Wagner G.J.: Surface disposition and stability of pest-interactive, trichome-exudated diterpenes and sucrose esters of tobacco. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1907–1921 (1994)
30. Lindow S.E., Brandl M.T.: Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1875–1883 (2003)
31. Liu L., Li Y., Liu S.C., Zheng Z.H., Chen X.L., Zhang H., Guo L.D., Che Y.S.: Chloropestolide A, an antitumor metabolite with an unprecedented spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici*. *Organ. Lett.* **11**, 2836–2839 (2009)
32. Liu L., Bruhn T., Guo L.D., Götz D.C.G., Brun B.R., Stich A., Che Y.S., Bringmann G.: Chloropupekeanolides CeE, cytotoxic pupukeanane chlorides with a spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici*. *Chem. Europ. J.* **17**, 2604–2613 (2011)
33. Lopez-Velasco G., Welbaum G.E., Falkinham III J.O., Ponder M.A.: Phyllosphere bacterial community structure of spinach (*Spinacia oleracea*) as affected by cultivar and environmental conditions at time of harvest. *Diversity*, **3**, 721–738 (2011)
34. Lozupone C.A., Knight R.: Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol.* **32**, 557–578 (2008)
35. Mano H., Morisaki H.: Endophytic bacteria in the rice plant. *Microb. Environ.* **23**, 109–117 (2008)
36. Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F., Osler R.: DNA- Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* **93**, 993–998 (2009)
37. Mechamber W.: Mapping uncharted territory: nanoscale leaf surface topology (w) Phyllosphere Microbiology, red. S.E. Lindow, E.I. Hecht-Poinar, V.J. Elliott, APS Press, St. Paul, USA, 2002, s. 43–50.
38. Meyer K.M., Leveau J.H.: Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts. *Oecologia*, **168**, 621–629 (2012)
39. Mulligan C.N.: Recent advances in the environmental applications or biosurfactants. *Curr. Opin. Colloid. Inter. Sci.* **14**, 372–378 (2009)
40. Newton A.C., Fitt B.D.L., Atkins S.D., Walters D.R., Daniel T.J.: Pathogenesis parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trend. Microbiol.* **18**, 365–373 (2010)
41. Perelló A.E., Moo C.: Status and progress of biological control of wheat (*Triticum aestivum* L.) foliar diseases in Argentina. *Fitosanidad*, **11**, 1 (2007)
42. Perelló A., Simón M.R., Arambarri A.M., Cordo C.A.: Greenhouse Screening of the Saprophytic Resident Microflora for Control of Leaf Spots of Wheat (*Triticum aestivum*). *Phytoparasitica*, **29**, 341–351 (2001)
43. Peterson J., Guyer M. i wsp.: NIH human microbiome project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
44. Pincebourde S., Woods H.A.: Climate uncertainty on leaf surfaces: the biophysics of leaf microclimates and their consequences for leaf-dwelling organisms. *Funct. Ecol.* **26**, 844–853 (2012)
45. Pornsunthorntawee O., Wongpanit P., Chavadej S., Abe M., Rojivavant R.: Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Biores. Technol.* **99**, 1589–1595 (2008)
46. Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N., Teamroong N.: The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa*). *App. Soil Ecol.* **42**, 141–149 (2009)
47. Purahong W., Hyde K.D.: Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal Divers.* **47**, 1–7 (2011)
48. Quince C., Lanzen A., Curtis T.P., Davenport R.J., Hall N., Head I.M., Read L.F., Sloan W.T.: Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat. Methods*, **6**, 639–641 (2009)

49. Rivera-Orduña F.N., Suarez-Sanchez R.A., Flores-Bustamante Z.R., Gracida-Rodriguez J.N., Flores-Cotera L.B.: Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Divers.* **47**, 65–74 (2011)
50. Rocha A.C.S., Garcia D., Uetanabaro A.P.T., Carneiro R.T.O., Araújo I.S., Mattos C.R.R., Góes-Neto A.: Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Divers.* **47**, 75–84 (2011)
51. Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S.: Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* **182**, 314–330 (2009)
52. Ruppel S., Hecht-Buchholz C., Remus R., Ortmann U., Schmelzer R.: Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* and within wheat: an investigation using electron microscopy. *Plant Soil*, **145**, 261–273 (1992)
53. Shirtcliffe N.J., McHale G., Atherton S., Newton M.N.: An introduction to super-hydrophobicity. *Adv. Colloid Interfac.* **161**, 124–138 (2010)
54. Scherlach K., Hertweck C.: Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganism. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 1753–1760 (2009)
55. Shepherd R.W., Wagner G.J.: Phylloplane protein: emerging defenses AT the aerial frontline? *Trend. Plant Sci.* **12**, 51–56 (2006)
56. Sun J.Q., Guo L.D., Zang W., Ping W., Chi D.F.: Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Sci. China Ser. C*, **51**, 751–759 (2008)
57. Sun X., Guo L.D., Hyde K.D.: Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Divers.* **47**, 85–95 (2011)
58. Sundin G.W.: Ultraviolet radiation on leaves: its influence on microbial communities and their adaptations (w) Phyllosphere Microbiology, red. S.E. Lindow, E.I. Hecht-Poinar, V.J. Elliott, APS Press, St. Paul, USA, 2002, s. 27–41.
59. Suryanarayanan T.S., Murali T.S., Thirunavukkarasu N., Rajulu M.B.G., Venkatesan G., Sukumar R.: Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers. Conserv.* **20**, 913–928 (2011)
60. Szweykowska A., Szweykowski J.: Botanika. Morfologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, Tom 1., 2005, s. 133–137.
61. Taylor P.: The wetting of leaf surfaces. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.* **16**, 326–334 (2011)
62. Thakuria D., Schmidt O., Siurtaim M.M., Egan D., Doohan F.M.: Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1390–1403 (2008)
63. Tikhonovich I.A., Provorov N.A.: From plant – microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the inter-species genetic integration. *Ann. Appl. Biol.* **154**, 341–350 (2009)
64. Unterseher M., Schnittler M.: Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycol. Res.* **113**, 645–654 (2009)
65. Wachowska U.: Zmiany w zbiorowiskach drobnoustrojów zasiedlających liście pszenicy ozimej zachodzące pod wpływem fungicydów i stymulatorów odporności roślin. Rozprawy i monografie 135, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, 2008.
66. Walker J.F., Aldrich-Wolfe L., Riffel A., Barbare H., Simpson N.B., Trowbridge J., Jumpponen A.: Diverse Helotiales associated with the roots of three species of Arctic Ericaceae provide no evidence for host specificity. *New Phytol.* **191**, 515–527 (2011)
67. Whipps J.M., Hand P., Pink D., Bending G.D.: Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1744–1755 (2008a)
68. Whipps J.M., Hand P., Pink D., Bending G.D.: Human pathogens and the phyllosphere. *Adv. Appl. Microbiol.* **64**, 183–221 (2008b)
69. Wu C.H., Bernard S.M., Andersen G.L., Chen W.: Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microb. Biotechnol.* **2**, 428–440 (2009)
70. Xie Z., Dou Y., Ping S., Chen M., Wang G., Elmerich C., Lin M.: Interaction between NifL and Nif A in the nitrogen – fixing *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Microbiology*, **152**, 3535–3542 (2006)
71. Yuan Z., Zhang C., Lin F.: Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance to stress: progress and approaches. *J. Plant Growth Reg.* **29**, 116–126 (2010)
72. Zabalgoitia I.: Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Span. J. Agric. Res.* **6**, 138–146 (2008)
73. Zhang B., Bai Z., Hoefel D., Tang L., Wang X., Li B., Li Z., Zhuang G.: The impact of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the papper plant phyllosphere. *Sci. Total Environ.* **407**, 1915–1922 (2009)