

JOLANTA BEHNKE-BOROWCZYK, HANNA KWAŚNA

Wpływ metodyki badań na ocenę struktury zbiorowisk mikroorganizmów w glebie leśnej*

Effect of the methodology of studies on the structure of the microorganisms communities in the forest soil

ABSTRACT

Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H. 2016. Wpływ metodyki badań na ocenę struktury zbiorowisk mikroorganizmów w glebie leśnej. Sylwan 160 (6): 492-503.

Two different communities of microorganisms were identified in soils by application of the classical method of fungi isolation (soil dilution, culturing on artificial media, morphotyping) and a molecular method (extraction of the environmental DNA, amplification with universal primers NS1 and NS2, cloning and sequencing of representative clones). No organisms were common to both communities. Apart from rare representatives of the *Animalia*, communities included single fungus-like *Eucarya* belonging to the *Protista*, Class *Oomycota*, and numerous fungi belonging to *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* and *Basidiomycota* orders. In total, 88 species were identified in four soil samples. Fungi were mostly *Ascomycota*. The classical method was particularly effective in detection of fungi important for creation of phytosanitary conditions of soil, i.e. antagonists (*Penicillium*, *Tolyopcladium* and *Trichoderma*) and potential stimulants (dark-pigmented *Hormiactis candida*, *Humicola* spp. and *Phialophora* spp.) of phytopathogens (including the common forest genera *Armillaria* and *Heterobasidion*). Application of the classical method allowed the detection of mycorrhizal *Ascomycota* from the genus *Oidiodendron*. Application of the molecular method allowed the detection of 13 mycorrhizal *Basidiomycota*. Although primers NS1 and NS2 were designed from a match with DNA of culturable organisms, they also amplified the DNA of non-culturable organisms. This emphasizes their potential usefulness in studies of the biodiversity of microorganisms in environmental samples. The shortage of reference sequences in the database discourages use of the 18S rDNA region in studies on fungal communities. The studies on the biodiversity of microorganisms need the application of a few independent methods of detection and identification.

KEY WORDS

classical method of isolation, fungi, microorganisms, NS1, NS2, 18S rDNA, soil

ADDRESSES

Jolanta Behnke-Borowczyk – e-mail: jbehnke@up.poznan.pl

Hanna Kwaśna – e-mail: kwasna@up.poznan.pl

Katedra Fitopatologii Leśnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

*Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki (DEC-2011/01/N/NZ8/00065).

Wstęp

Mikroorganizmy występują we wszystkich środowiskach i stanowią istotny element ekosystemu ziemskiego. Ich obecność i działalność jest warunkiem podtrzymywania życia na Ziemi. Mikroorganizmy: uczestniczą w obiegu węgla, azotu, fosforu i innych pierwiastków budulcowych oraz zwiększają dostępność jonów amonowych dla roślin, rozkładają i mineralizują substancję organiczną i nieorganiczną, uwalniają do podłoża, transportują i udostępniają roślinom wiele związków i pierwiastków, tworzą i odnawiają związki humusowe, kształtujące strukturę i żyzność gleby, kształtują właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne gleby, uczestniczą w procesach glebotwórczych oraz transportują wodę i wpływają na ciśnienie osmotyczne roślin [Christensen 1989]. Poprzez udział w obiegu materii i energii uczestniczą w kształtowaniu biosfery. Dodatkowo, okresowo lub lokalnie, immobilizują związki chemiczne i pierwiastki, gromadzą metale ciężkie, uczestniczą w detoksykacji gleby i w samooczyszczaniu się zbiorników wodnych oraz przyczyniają się do powstawania złóż składających się z produktów ich metabolizmu [Christensen 1989; Nicklin i in. 2002]. Mikroorganizmy glebowe wykorzystywane są do produkcji żywności, leków, białka, preparatów enzymatycznych, związków i substancji chemicznych, diagnostyki mikrobiologicznej, oczyszczania ścieków, dezaktywacji i utylizacji odpadów przemysłowych i bioremediacji oraz biologicznej ochrony roślin przed grzybami, owadami i chwastami. Różnorodność genetyczna mikroorganizmów glebowych może być źródłem szczepów o pożądanych właściwościach biotechnologicznych wykorzystywanych przez przemysł [Behnke-Borowczyk, Kwaśna 2010].

Chorobotwórcze mikroorganizmy glebowe mogą być sprawcami wielu chorób roślin, zwierząt i ludzi. Z kolei bioróżnorodność mikroorganizmów chroni rośliny, zwierzęta i ludzi przed patogenami. Możliwe jest to dzięki różnorodnej strategii życia mikroorganizmów, a szczególnie różnorodnych mechanizmów konkurencji między nimi o poszczególne czynniki środowiska, głównie składniki pokarmowe, pozycję biosocjalną czy światło. Konkurencja ogranicza możliwość występowania w danym środowisku jakiegokolwiek organizmu jako monokultury [Whipps 2001]. Współistnienie wielu różnych gatunków decyduje o trwałości i harmonii naturalnych ekosystemów i ma podstawowe znaczenie dla przebiegu ewolucji. Wszystkie wymienione relacje zmuszają do badania bioróżnorodności mikroorganizmów oraz sposobów jej wzbogacenia.

Mikroorganizmy cechuje niewyobrażalna bioróżnorodność. Każde środowisko to niepowtarzalny ekosystem. Najwięcej mikroorganizmów występuje w uprawnej warstwie gleby (na głębokości 5-20 cm, są to głównie organizmy tlenowe) oraz wokół korzeni roślin (w ryzosferze). W warstwie ornej na 100 m² znajduje się około 70 kg masy bakterii, 70 kg masy promieniowców i 10-15 kg masy grzybów. Grzyby stanowią 1,33% objętości gleby i 0,2% jej ciężaru. Wśród 10 mln komórek mikroorganizmów znajdujących się w gramie gleby od 75 tys. do 1,5 mln stanowią zarodniki grzybów [Watanabe 2002; Kwaśna 2014]. W glebie w warunkach naturalnych mikroorganizmy żyją w zbiorowiskach składających się z wielu gatunków. Skład zbiorowiska zależy od właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych gleby (temperatury, wilgotności, pH, zawartości materii organicznej, charakteru i rozmieszczenia roślin) oraz od wzajemnych relacji między wszystkimi komponentami ekosystemu [Doran 1980; Collins i in. 1992; Fils i in. 1993; Anderson 1998; Lundquist i in. 1999; Zelles 1999; Marstorp i in. 2000; Bååth, Anderson 2003].

Dotychczasowe badania nad strukturą mikroorganizmów gleb leśnych w Polsce prowadzono metodami klasycznymi [Mańka 1964, 1974, 1976, 1978, 1988; Kwaśna 1995, 1997a, b; Sierota, Kwaśna 1999; Mańka i in. 2006]. Detekcja i identyfikacja grzybów oparta na morfotypowaniu uwzględniała cechy morfologiczne grzybni oraz sposób zarodnikowania. Wymagała czasu, wiedzy i doświadczenia. Zawodziła w przypadku sterylności kultur, braku cech typowych i małego zróżni-

cowania między- i wewnątrzgatunkowego oraz pomijała organizmy niehodowlalne *in vitro*. Umożliwiła wykrycie maksymalnie 50% mikroorganizmów występujących w danym środowisku.

Techniki biologii molekularnej, takie jak izolacja DNA, PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy), klonowanie, sekwencjonowanie, RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) oraz DGGE (elektorforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego), są powszechnie stosowane w detekcji i identyfikacji mikroorganizmów glebowych. Metody te opierają się na analizie struktury kwasów nukleinowych lub białek i wykorzystują podobieństwo w ich sekwencji i budowie. Reakcja łańcuchowej polimerazy umożliwia amplifikację DNA, a porównanie DNA badanego organizmu z DNA wzorca znajdującego się w bazie danych umożliwia precyzyjną identyfikację.

Celem badań było poznanie i porównanie struktury zbiorowisk mikrogrzybów w glebie leśnej badanej metodą klasyczną i molekularną. W metodzie molekularnej zastosowano uniwersalne startery NS1 i NS2 dla regionu 18S rDNA, spodziewając się ich dużej skuteczności w detekcji grzybów, zwłaszcza gatunków wolno rosnących, synergistycznych (wspierających się nawzajem) lub niehodowlalnych. Struktura zbiorowisk mikroorganizmów glebowych umożliwiła rozpoznanie walorów fitosanitarnych gleb leśnych po różnym sposobie przygotowania gleby i utylizacji pozostałości zrębowych.

Material i metody

Próby gleb pobrano z jednorocznej uprawy sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Nadleśnictwie Bierzwnik, oddz. 89g (53°02'08"N 15°39'54"E) oraz z 40-letniego drzewostanu sosnowego w Nadleśnictwie Międzychód, oddz. 30a (52°36'03,60"N 15°53'23,58"E). W Nadleśnictwie Bierzwnik przed posadzeniem sadzonek usunięto wszystkie pozostałości po zrębowe, a glebę odłożono na srodek naorywaczem wałków, tworząc wał pod sadzonki (gleba 1), lub zaniechano przygotowania gleby i pozostawiono igły opadłe z 80-letnich sosen (gleba 2). W Nadleśnictwie Międzychód wykonano w 1970 roku pełną orkę głęboką, rozdrobienie wszystkich pozostałości po zrębowych i wymieszanie ich z glebą (gleba 3) lub glebę wzruszono broną talerzową na krzyż i pozostawiono wszystkie pozostałości po zrębowe (gleba 4).

Klasyczną izolację zbiorowisk grzybów glebowych wykonano metodą rozcieńczeń Warcupa [1950, 1955]. Grzyby identyfikowano w oparciu o klucze mykologiczne [Pitt 1979; Domsch i in. 1980; Klich, Pitt 1992]. Badanie DNA wykonano po ekstrakcji próbki środowiskowej zestawem Power Soil^M DNA Isolation Kit (Mo BIO Laboratories, Inc. Nr kat. 12888-50). Region 18S rDNA amplifikowano uniwersalnymi starterami NS1 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCTC 3') i NS2 (5' GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC 3') [White i in. 1990] metodą PCR. Produkty PCR oczyszczano zestawem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Crawley, UK) i klonowano przy pomocy pGEM-T Easy (Promega Corporation Madison, WI, USA). Tworzono biblioteki klonów dla każdej analizowanej gleby. Klony poddano wstępnej selekcji na pożywcze z X-gal. Reprezentatywne klony amplifikowano, a następnie poddano ponownej selekcji, badając polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) z dwoma enzymami restrykcyjnymi (*HhaI* i *BsuRI*). Grupę klonów o identycznych wzorach trawienia dwoma enzymami zdefiniowano jako operacyjną jednostkę taksonomiczną (OTU). Założono, że wszystkie klony z jednego OTU w indywidualnej bibliotece należą do tego samego taksonu. Reprezentatywne klony oczyszczano i sekwencjonowano metodą Sangera w Centrum Badań DNA (Poznań). Sekwencje poszczególnych OTU porównano z sekwencjami referencyjnymi z bazy danych NCBI, wykorzystując algorytm BLAST. Każda sekwencja została zidentyfikowana do możliwie najniższej rangi taksonomicznej. Frekwencja taksonu wyrażona jest jego procentowym udziałem w zbiorowisku.

Wyniki

W wyniku izolacji mikroorganizmów badanymi metodami otrzymano zbiorowiska o różnym składzie gatunkowym. W skład zbiorowisk wchodziły pojedyncze grzybopodobne organizmy eukariotyczne zaliczane do królestwa *Protista*, typu *Oomycota* oraz liczne grzyby z czterech gromad: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* i *Basidiomycota* (tab.). Z czterech gleb otrzymano łącznie 88 gatunków grzybów.

Z gleby 1 i 2 po zastosowaniu metody klasycznej otrzymano odpowiednio 3351 i 178 izolatów reprezentowanych przez 17 i 29 gatunków grzybów, głównie z gromady *Ascomycota*. Przeważały grzyby z rodzajów *Penicillium* (14 i 7 gatunków, 95,29 i 77,44% wszystkich grzybów). Najliczniej wystąpiły *P. adametzii* (78,5 i 5,61%), *P. citreonigrum*, *P. daleae* i *P. janczewskii*. Wśród grzybów z rodzaju *Trichoderma* (4,02 i 11,89%) najliczniejsze były *T. koningii*, *T. pubescens* i *T. viride*. Po zastosowaniu metody molekularnej otrzymano 107 i 135 klonów z insertem. Wśród nich były klony grzybów należących do 5 znanych gatunków. *Phialocephala fortinii* wystąpił w obu glebach, *Auricularia polytricha* i *Rhodospidium toruloides* tylko w glebie 1, a *Melanomma pulvis-pyrius* i *Thanatephorus cucumeris* w glebie 2. Dla większości klonów (88,23 i 80,94%) z krótkimi sekwencjami (do 200 pz) nie znaleziono sekwencji referencyjnych w bazie danych NCBI.

Z gleby 3 i 4 po zastosowaniu metody klasycznej otrzymano odpowiednio 1184 i 875 izolatów reprezentowanych przez 33 i 29 gatunków grzybów z gromady *Zygomycota* i *Ascomycota*. Przeważały grzyby z rodzaju *Penicillium* (11 i 9 gatunków, 71,15 i 81,6%). Najliczniej wystąpiły *P. adametzii* (10,81 i 37,19%), *P. janczewskii* (9,29 i 33,52%) i *P. terlikowskii* (35,14 i 0,57%). Wśród grzybów z rodzaju *Oidiodendron* (21,1 i 3,63) najliczniej wystąpiły *O. scytaloides* (13,23%), *O. chlamydosporicum* (5,24%) i *O. rhodogenum* (2,63%). Po zastosowaniu metody molekularnej otrzymano 90 i 120 klonów z insertem. Były one reprezentowane przez 28 i 15 taksonów grzybowych należących do *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* i *Basidiomycota*. Liczniej wystąpiły *Amanita novinupta* (7,2%), *Calycellinopsis xishuangbanna* (11,7%), *Leucosporidium antarcticum* (7,2%), *Penicillium* spp. (64,78%), *Piloderma fallax* (10,8%), *Tolypocladium geodes* (6,59%), *Trichoderma* spp. (5,22%) i *Tylospora asterophora* (8,1%). W glebie 4 stwierdzono obecność grzybów niehodowlanych *in vitro*. Dla 8,8% klonów nie znaleziono sekwencji referencyjnych w bazie danych NCBI. W glebach z Międzychodu frekwencja grzybów wynosiła 62,1-64,8%. Pozostałe taksony należały do królestwa *Animalia* (*Alicorhagidia* sp., *Enchodelus macrodorus* de Man, *Isotoma viridis* Bourlet, *Marionina clavata* Nielsen & Christensen) lub *Protista* (*Cercomonadida* sp., *Cercosoa* spp., *Epispathidium papilliferum* Kahl, *Ochromonadaceae*, *Physochila griseola* Penard, *Stramenopile*, *Trachelocorythion pulchellum* Penard). W glebie z Bierzwnika były tylko pojedyncze taksony z królestwa *Animalia*.

Dyskusja

Wiedza na temat różnorodności mikroorganizmów w glebie jest ograniczona z powodu trudności metodologicznych w ich izolacji oraz problemów z identyfikacją taksonomiczną. Ciągłe badane są powiązania struktury (w tym różnorodności) zbiorowisk mikroorganizmów z ich funkcją. Przy czym różnorodność ujmowana jest zwykle jako różnorodność gatunkowa, wynikająca z różnorodności genetycznej. Różnorodność między- i wewnątrzgatunkowa wynika z ogólnej liczby gatunków i szczepów.

W glebie leśnej dominują wśród mikroorganizmów grzyby, głównie z uwagi na optymalne warunki rozwoju, tj. wysoką kwasowość i zawartość preferowanych przez wiele grzybów źródeł pokarmu (celulozy i ligniny). Baza pokarmowa, która trafia do gleby, jest zróżnicowana. Stanowi

Tabela.

Frekwencja [%] poszczególnych taksonów w zbiorowiskach mikroorganizmów z badanych gleb ustalona metodą klasyczną (K) i molekularną (M)
 Frequency [%] of taxons in the communities of microorganisms in analysed soils determined with classical (K) or molecular (M) method

	Bierzwnik				Międzyczód			
	1K	2K	1M	2M	3K	4K	3M	4M
<i>Phytophthora citricola</i> Sawada	0,56							
<i>Oomyco</i> Razem; Total	0,56							
<i>Rhizidium phycophilum</i> K.T. Picard								2,7
Chytridiomycota								2,7
<i>Mortierella cystojenkini</i> W. Gams & Veenb.-Rijks + <i>M. echinosphaera</i> Plaäts-Nit. + <i>M. fimbriatistis</i> W. Gams + <i>M. verticillata</i> Linnem. + <i>Mortierella</i> spp.					0,11	0,08	25,2	1,8
<i>Umbelopsis autotrophica</i> (E.H. Evans) W. Gams + <i>U. ramanantiana</i> (Möller) W. Gams					0,11	0,08	7,2	0,9
<i>Zygomycota</i> Razem; Total	0,56				0,23	0,42	32,4	2,7
<i>Acremonium fusidioides</i> (Nicot) W. Gams								
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. + <i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church + <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab. + <i>A. spinulosus</i> Warcup					0,11	0,25		2,7
<i>Blastobotrys terrestris</i> (Van der Walt & Johannsen) Kurtzman & Robnett								0,9
<i>Botrytis anthophila</i> Bondartsev		0,03						
<i>Calycellinopsis xishuanganna</i> W.Y. Zhuang								11,7
<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout	2,25							
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries + <i>C. herbarum</i> (Pers.) Link	2,25	0,03				0,25		
<i>Drechslera</i> cf. <i>dematioides</i> (Bubák & Wrobl.) Subram. & B.L., Jain		0,03						
<i>Gibberella tricinata</i> El-Gholl, McRitchie, Schoultz. & Ridings		0,03						
<i>Hormiactis candida</i> Höhn.	0,56							
<i>Humicola grisea</i> Traeen + <i>H. fuscoatra</i> Traeen					0,11	0,42		
<i>Hyaloscypa daedaleae</i> Velen.							10,8	
<i>Melanomma pulvis-pyrus</i> (Pers.) Fuekel								0,9
<i>Meliniomyces variabilis</i> Hambl. & Sigler				2,72				
<i>Microscypha cajantensis</i> Huhtinen								4,5
<i>Oidiendron chlamydosporicum</i> Morrall + <i>O. griseum</i> Robak + <i>O. periconioides</i> Morrall + <i>O. pilicola</i> Kobayasi + <i>O. rhodogenum</i> Robak + <i>O. scytaloides</i> W. Gams & B.E. Söderstr. + <i>O. tenuissimum</i> (Peck) S. Hughes					0,54			
					21,1	3,63		

Tabela ciąg dalszy

	Bierzwnik				Międzyczód			
	1K	2K	1M	2M	3K	4K	3M	4M
<i>Paeclionyces carneus</i> (Duché & R. Heim) A.H.S. Br. & G. Sm.	0,56							
<i>Pentallium adametsii</i> Zaleski + <i>P. aurantigriseum</i> Dierckx + <i>P. canescens</i> Sopp								
+ <i>P. citreotigrum</i> Dierckx + <i>P. citrinum</i> Thom + <i>P. commune</i> Thom + <i>P. corylophilum</i> Dierckx								
+ <i>P. daleae</i> Zaleski + <i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling + <i>P. glaucoalbidum</i> (Desm.) Houbraken								
& Samson + <i>P. jancewskii</i> Zaleski + <i>P. pinophilum</i> Thom + <i>P. sacculum</i> E. Dale + <i>P. simpli-</i>	77,44	95,29			71,15	81,6	7,2	0,9
<i>issimum</i> (Oudem.) Thom + <i>P. solitum</i> Westling + <i>P. spinulosum</i> Thom + <i>P. steckii</i> Zaleski +								
<i>P. terlikowskii</i> Zaleski + <i>P. thomii</i> Maire + <i>P. velutinum</i> J.F.H. Beyma + <i>P. vinaceum</i> J.C. Gilman								
& E.V. Abbott + <i>Talaromyces funiculatus</i> (Thom) Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert								
<i>Pseudogymnoascus pennorum</i> (Link) Minnis & D. L. Lindner					0,34	0,25		
<i>Stachybotrys echinata</i> (Rivolta) G. Sm.					2,86	0,68		
<i>Torulomyces indicus</i> (S.B. Saksena) M.H. Hashmi, W.B. Kendr. & E.B.G. Jones	0,56							
<i>Phialocephala fortinii</i> C.J.K. Wang & H.E. Wilcox		2,72	2,14		0,57			0,9
<i>Phialophora pinicola</i> Morgan-Jones + <i>P. bubakii</i> (Laxa) Schol-Schwarz + <i>Phialophara</i> sp.	1,12							
& G.L. Barron) W. Gams	0,56				0,11			
<i>Sphaerodes fimitcola</i> (E.C. Hansen) P.F. Cannon & D. Hawksw.						0,51		
<i>Tohyopocladium geodes</i> W. Gams					1,60	6,59		
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai + <i>T. hamatum</i> (Bonord.) Baimier + <i>T. koningii</i> Oudem +								
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai + <i>T. polysporum</i> (Link) Rifai + <i>T. pubescens</i> Bissett + <i>T. strigosum</i>	11,89	4,02			1,60	5,24		
Bissett + <i>T. virens</i> J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster + <i>T. viride</i> Pers.								
<i>Verpa conica</i> (O.F. Müll.) Sw.							3,52	
Ascomycota Razem; Total	97,75	99,97	5,44	2,14	99,89	99,83	21,6	22,50
<i>Amanita novinupta</i> Tuulos & J. Lindgr.							7,2	2,7
<i>Anthracocephalum archeri</i> (Berk.) Pegler								0,9
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc.				3,21				

ją głównie biomasa z drzew i roślin oraz runa (liście, korzenie) bezpośrednio lub po ich częściowym przetworzeniu przez mikroorganizmy [Badura 2002]. Analizując zbiorowisko grzybów glebowych, możemy m.in. wyciągać wnioski o charakterze środowiska, w jakim one bytują. Martyn i Skwaryło-Bednarz [2005] przeprowadzili analizę mikrobiologiczną gleby z rejonu Roztoczańskiego Parku Narodowego. Zaobserwowali, że wraz ze wzrostem intensywności gospodarki leśnej dochodzi do spadku liczebności grzybów glebowych. Związane jest to z dostarczaniem substancji organicznej do gleby i zmianą odczynu. Podobne wyniki otrzymano w glebach Puszczy Niepołomickiej, jednak tutaj wpływ na otrzymane wyniki miała również niska temperatura w miesiącach zimowych [Galus-Barchan, Paśmionka 2014]. Zbyt wysoka wilgotność ma wpływ na liczebność grzybów. Niewolak i in. [2007], analizując ryzosferę gleb z terenów śródleśnych mokradeł Puszczy Niepołomickiej, zaobserwowali zmniejszoną liczebność grzybów. Zbyt duża ilość wody w glebie wiąże się ze zmniejszonym dostępem powietrza, co wpływa ujemnie na rozwój mikroorganizmów glebowych [Martyn, Skwaryło-Bednarz 2005].

Zastosowanie starterów NS1 i NS2 dla 18S rDNA często dostarcza informacji o grzybach i pozwala na ich charakterystykę. Zastosowane startery były wykorzystywane w badaniu składu mykobioty korzeni drzew i gleb leśnych. Anderson i in. [2003] z dużą skutecznością użyli starterów NS1 i NS2 do detekcji grzybów w glebie. Filion i in. [2004] zastosowali startery NS1 i NS2 do detekcji mikroorganizmów w ryzosferze siewek świerka. Singh i in. [2012] umiarkowanie skutecznie użyli powyższych starterów do badania zbiorowisk grzybowych w osadach morskich. W badaniach Bertini i in. [1999] startery NS1 i NS2 skutecznie amplifikowały DNA grzybów mykoryzowych.

Tabela prezentuje otrzymany skład zbiorowisk grzybów glebowych z uwzględnieniem niższej rangi taksonomicznej poszczególnych mikroorganizmów. Prac tego typu jest niewiele, np. praca Anderson i in. [2003]. Najczęściej prace nad bioróżnorodnością mikrobiologiczną prezentują ogólny udział większych grup mikroorganizmów (głównie bakterii) w zbiorowiskach i unikają podania przynależności taksonomicznej stwierdzanych mikroorganizmów, co uniemożliwia ocenę charakteru środowiska, w tym stanu fitosanitarne gleby.

Liczba stwierdzonych gatunków była wyższa po zastosowaniu klasycznej metody izolacji grzybów (z mieszaniny glebowo-piaskowej), hodowli na pożywkach i identyfikacji opartej na morfotypowaniu. Ekstrakcja środowiskowego DNA i amplifikacja 18S rDNA z zastosowaniem pojedynczej pary starterów uniwersalnych NS1 i NS2 okazała się mniej skuteczna w detekcji grzybów glebowych, mimo że przydatność regionu 18S rDNA do badania grzybów i organizmów eukariotycznych jest niepodważalna.

Większość zidentyfikowanych grzybów należała do *Ascomycota*. Najczęściej były to typowe gatunki glebowe związane z fazą stałą gleby. Sporadycznie stwierdzano endofity – organizmy pasożytnicze, symbiotyczne lub komensaliczne, żyjące wewnątrz roślin lub zwierząt. Metoda klasyczna była częściej skuteczna w detekcji grzybów kształtujących fitosanitarne właściwości gleby, tj. antagonistów (*Penicillium* spp., *Tolyposcladium* spp. i *Trichoderma* spp.) i potencjalnych stymulantów (ciemno zabarwione *Hormiactis candida*, *Humicola* spp., i *Phialophora* spp.) organizmów fitopatogenicznych. Wiedza na temat ich obecności w glebie jest cenna, potrzebna i wykorzystywana w praktyce. Grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Tolyposcladiu* i *Trichoderma* są bezkonkurencyjnymi antagonistami wielu patogenów glebowych i korzeniowych, włączając powszechnie występujące patogeny lasu *Armillaria* spp. i *Heterobasidion* spp. [Hyppel 1968; Sierota 1976; Lundgren i in. 1978; Nelson i in. 1989; Reaves i in. 1990; Dumas, Boyonoski 1992; Fox i in. 1994; Onsaldo, Waudo 1994; Highley 1997; Harman 2006; Szwajkowska-Michałek i in. 2012]. W zależności od sytuacji działają poprzez skuteczną konkurencję w zdobywaniu pokarmu, przestrzeni życiowej,

antybiozę, mykopasożytnictwo lub poprawę kondycji roślin. Gatunki ciemno zabarwione z reguły stymulują wzrost grzybów z rodzaju *Armillaria* i *Heterobasidion in vitro* i przypuszcza się, że w podobny sposób będą działały w naturze.

Zastosowanie metody klasycznej umożliwiło detekcję mykoryzowych *Ascomycota* z rodzaju *Oidiodendron*. W drzewostanach tworzą one mykoryzę ericoidalną z roślinami wrzosowatymi (*Ericaceae*), głównie z borówką (*Vaccinium* spp.). *Oidiodendron* częściej wystąpił w 40-letnim drzewostanie, co ma bezpośredni związek z obecnością roślin-partnerów w runie leśnym [Xiao, Berch 1995; Martino i in. 2007] i stabilizacją kwasowości gleby (optymalne pH=3,0-5,0). Zwiększona liczba roślin-gospodarzy w 40-letnim drzewostanie sprzyjała zarówno pojawieniu się *Oidiodendron*, jak i zróżnicowaniu gatunkowemu. Stwierdzono aż 7 gatunków. Metoda klasyczna była jednak nieskuteczna w detekcji *Basidiomycota*, podczas gdy metoda molekularna umożliwiła zidentyfikowanie 13 taksonów. Nie stwierdzono żadnych gatunków wspólnych dla obu metod izolacji.

Region 18S rDNA jest jednak podobny u grzybów i innych *Eucarya*. W badaniach Hagn i in. [2003] startery NS1 i NS2 były komplementarne z 70% regionu 18S DNA grzybów i z 75-90% regionu 18S DNA innych *Eucarya*, co sugeruje ich uniwersalność. W niniejszych badaniach startery NS1 i NS2 okazały się także mało specyficzne dla grzybów. Amplifikowały również DNA mikroorganizmów należących do królestwa *Animalia* i *Protista*.

Pomimo że startery NS1 i NS2 zostały opracowane na podstawie budowy DNA organizmów hodowlanych, skutecznie amplifikowały również DNA organizmów niehodowlanych (w glebie 3 11,2%, w glebie 4 – 27%), co podkreśla ich ewentualną przydatność do badań różnorodności mikroorganizmów w próbkach środowiskowych.

Grzyby glebowe reagują szybko i zdecydowanie na zmiany warunków fizykochemiczno-biologicznych gleby kształtujących się pod wpływem stosowanych zabiegów hodowlanych i roślinności. Analizując gleby potraktowane w różny sposób w bliższej i dalszej przeszłości, spodziewano się dużych różnic w składzie i aktywności zbiorowisk grzybowych. I rzeczywiście, bardziej zróżnicowane i liczniejsze (Międzychód) zbiorowiska grzybów wystąpiły po rezygnacji z przygotowania gleby lub ograniczonej i odległej w czasie uprawie (wzruszenie gleby broną talerzową na krzyż 40 lat wcześniej). Wydaje się, że umiarkowana interwencja w środowisko glebowe na zrębie zapobiegła nadmiernemu wzrostowi natlenienia, co spowolniło rozkład materii organicznej. W konsekwencji utrzymywała się trwale stała i wysoka liczebność i różnorodność mikroorganizmów.

Wśród grzybów należących do gromad *Ascomycota* i *Basidiomycota* zidentyfikowano gatunki opisywane jako kolonizujące martwe drewno (*Piloderma fallax*, *Rhodospodium toruloides*), korzenie drzew i runa leśnego (*Meliniomyces variabilis*), glebę (*Penicillium spinulosum*, *Tolyopcladium opacum*), gatunki mykoryzowe (*Melanomma pulvis-pyrius*, *Oidiodendron* spp., *Phialocephala fortinii*) [Grelet i in. 2005; Saito i in. 2006; Münzenberger i in. 2009], patogeny roślin (*Botrytis anthophila* na koniczynie czerwonej, *Auricularia polytricha*, *Gibberella tricineta*, *Thanatephorus cucumeris* na wielu roślinach), patogeny nicieni (*Paecilomyces carneus*) oraz gatunki chorobotwórcze dla człowieka (*Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Stachybotrys echinata*) i zwierząt (*Sagenomella* spp.).

Różnice w strukturze zbiorowisk mikrogrzybów badanych metodami klasycznymi i molekularnymi zaobserwowane podczas prezentowanych badań opisanych w niniejszym opracowaniu oraz przez innych badaczy [Viaud i in. 2000; Hunt i in. 2004; Menkis i in. 2006; Kwaśna i in. 2006, 2008; Kwaśna, Bateman 2009], a także detekcja niewielu gatunków wspólnych dla różnych metod (1,5-10,7%) zmuszają do jednoczesnego stosowania metod klasycznych i molekularnych. Anderson i Cairney [2004], Kwaśna i in. [2006, 2008] oraz Kwaśna i Bateman [2009] zalecają (w za-

leżności od celu i warunków badań) stosowanie 2-7 różnych metod detekcji mikroorganizmów w glebie. Większość z nich prezentują Behnke-Borowczyk i in. [2012]. Tylko łączne wyniki uzyskane różnymi metodami pozwalają poznać pełen zakres bioróżnorodności mikroorganizmów.

Duży wpływ na otrzymany wynik miał jednak wybór metody ekstrakcji DNA. Zastosowany zestaw umożliwiał prostą i szybką izolację środowiskowego DNA. Otrzymane DNA zostało skutecznie oczyszczone z kwasów humusowych zakłócających często późniejszą amplifikację DNA. Oczyszczanie z kłopotliwych składników gleby zwykle skutkuje 50-procentową bezpowrotną utratą DNA mogącego być źródłem informacji o pozostałych mikroorganizmach w glebie. Dodatkowo analizowano niewielką próbkę gleby – 1 g, stanowiącą niewystarczające źródło informacji o bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby.

Analiza filogenetyczna pozyskanego DNA może być użyta przynajmniej do częściowej identyfikacji dominujących grzybów przy dużej kompletności baz danych. Dla ponad 80% sekwencji mikroorganizmów w glebie z Bierzwnika nie znaleziono sekwencji referencyjnych regionu 18S rDNA w bazie danych. Świadczy to o jej niewielkiej kompletności i braku aktualizacji. Brak sekwencji referencyjnych dla sekwencji badanych zniechęca do używania regionu 18S rDNA w badaniach grzybów. Otrzymane wyniki potwierdziły skuteczność klasycznych metod izolacji grzybów dla określenia fitosanitarnych właściwości gleby oraz konieczność równoczesnego stosowania kilku metod izolacji dla określenia bioróżnorodności mikrobiologicznej gleby.

Literatura

- Anderson I. C., Cairney J. W. G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6: 769-779.
- Anderson I. C., Campbell C. D., Prosser J. I. 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* 5 (1): 36-47.
- Anderson T. H. 1998. The influence of acid irrigation and liming on the soil microbial biomass in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) K.) stand. *Plant and Soil* 199: 117-122.
- Bååth E., Anderson T. H. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 995-963.
- Badura L. 2002. Mikroorganizmy w ekosystemach lądowych. Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach. Katedra Mikrobiologii AR Kraków.
- Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H. 2010. Grzyby glebowe i ich znaczenie. *Sylwan* 154 (12): 846-850.
- Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H., Belka M. 2012. Metody molekularne stosowane w badaniu różnorodności mikroorganizmów glebowych. *Sylwan* 156 (4): 294-304.
- Bertini L., Amicucci A., Agostini D., Polidori E., Potenza L., Guidi Ch., Stocchi V. 1999. A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in Tuber species. *FEMS Microbiology Letters* 173 (1): 239-245.
- Christensen M. 1989. A view of fungal ecology. *Mycologia* 81: 1-19.
- Collins H. P., Rasmussen P. E., Douglas C. L. Jr. 1992. Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. *Soil Science Society of America Journal* 56: 783-788.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. 1980. *Compendium of soil fungi*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press: 1-892.
- Doran J. W. 1980. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Science Society of American Journal* 44: 765-771.
- Dumas M. T., Boyonoski N. W. 1992. Scanning electron microscopy of mycoparasitism of *Armillaria rhizomorphs* by species of *Trichoderma*. *European Journal of Forest Pathology* 22: 379-383.
- Filon M., Hamelin R. C., Bernier L., St-Arnaud M. 2004. Molecular Profiling of Rhizosphere Microbial Communities Associated with Healthy and Diseased Black Spruce (*Picea mariana*) Seedlings Grown in a Nursery. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (6): 3541-3551.
- Fils S. E., Glenn A. R., Dilworth M. J. 1993. The interaction between aluminium and root nodule bacteria. *Soli Biology & Biochemistry* 25: 403-417.
- Fox R. T. V., Mc Que A. M., West J. S., Raziq F. 1994. Use of antagonistic fungi to control *Armillaria* root rot. Brighton Crop Protection Conference. *Pests Disease* 3: 1115-1120.
- Galus-Barchan A., Paśmionka I. 2014. Występowanie wybranych mikroorganizmów w glebie na obszarze Puszczy Niepołomickiej ze szczególnym uwzględnieniem grzybów pleśniowych. *Polish Journal of Agronomy* 17: 11-17.

- Grelet G. A., Meharg A. A., Alexander I. J. 2005. Carbon availability affects nitrogen source utilization by *Hymenoscyphus ericae*. *Mycological Research* 109: 469-477.
- Hagn A., Pritsch K., Ludwig W., Schloter M. 2003. Theoretical and Practical Approaches to Evaluate Suitable Primer Sets for the Analysis of Soil Fungal Communities. *Acta Biotechnologica* 23 (4): 373-381.
- Harman G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Highley T. L. 1997. Control of wood decay by *Trichoderma (Gliocladium) virens*. I. Antagonistic properties. *Material und Organismen* 3: 7989.
- Hunt J., Boddy L., Randerson P. F., Rogers H. J. 2004. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology* 47: 385-395.
- Hyppel A. 1968. Studier over rötangrepp i särskador hos gran. Summary: Studies on decay in scars of Norway spruce. *Sveriges Skogsv. Förb.Tidskrift* 168: 675-713.
- Klich M. A., Pitt J. I. 1992. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.
- Kwaśna H. 1995. Fungal communities in soil beneath Scots pine and their stumps. Effect of fungi on *Heterobasidion annosum* and *Armillaria ostoyae* growth. *Acta Mycologica* 30: 193-205.
- Kwaśna H. 1997a. Antagonistic effect of fungi communities from Scots pine fine roots on *Heterobasidion annosum* (Fr.) and *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink growth. *Phytopathologia Polonica* 13: 133-146.
- Kwaśna H. 1997b. Antagonistic effect of fungi from Scots pine stump roots on *Heterobasidion annosum* and *Armillaria ostoyae*. *Acta Mycologica* 32: 369-381.
- Kwaśna H. 2014. *Mikrobiologia rolnicza*. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.
- Kwaśna H., Bateman G. L. 2009. Microbial communities in roots of *Pinus sylvestris* seedlings with damping-off symptoms in two forest nurseries as determined by ITS1/2 rDNA sequencing. *Forest Pathology* 39 (4): 239-248.
- Kwaśna H., Bateman G. L., Ward E. 2008. Determining species diversity of microfungual communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil Ecology* 40: 44-56.
- Kwaśna H., Ward E., Bateman G. L. 2006. Phylogenetic relationships among *Zygomycetes* from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. *Mycological Research* 110: 501-510.
- Lundgren B., Bååth E., Söderström B. E. 1978. Antagonistic effect of *Tohyopocladium* species. *Transactions of British Mycological Society* 70: 305-307.
- Lundquist E. J., Scow K. M., Jackson L. E., Uesugi S. L., Johnson C. R. 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming system to wet/dry cycle. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1661-1675.
- Mańka K. 1964. Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. *Prace Komisji Nauk Rolniczych i Leśnych PTPN* 17: 29-43.
- Mańka K. 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 160: 9-23.
- Mańka K. 1976. Nowa mikrobiologiczna metoda badania środowiska leśnego. *Folia Forestalia Polonica A* 22: 39-48.
- Mańka K. 1978. Środowisko a odporność roślin na choroby. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 198: 33-41.
- Mańka K. 1988. Wpływ środowiska na choroby roślin. *Roczniki Nauk Rolniczych E* 18: 9-16.
- Mańka M., Tyszkiewicz Z., Stępniewska-Jarosz S. 2006. Soil fungi communities effect on the growth of *Heterobasidion annosum* versus forest environment pollution. *Phytopathologia Polonica* 40: 43-56.
- Marstorp H., Guan X., Gong P. 2000. Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soil of different organic matter contents and pH. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 879-882.
- Martino E., Murat C., Vallino M., Bena A., Perotto S., Spanu P. 2007. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. *Current Genetics* 52: 65-75.
- Martyn W., Skwaryło-Bednarz B. 2005. Właściwości biologiczne gleb lekkich występujących w rejonie Roztoczańskiego Parku Narodowego. *Acta Agrophysica* 5 (3): 695-704.
- Menkis A., Vasiliauskas R., Taylor A. F. S., Stenström E., Stenlid J., Finlay R. 2006. Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathology* 55: 117-129.
- Münzenberger B., Bubner B., Wöllecke J., Sieber T. N., Bauer R., Flading M., Hüttl R. F. 2009. The ectomycorrhizal morphotype *Pinirhiza sclerotia* is formed by *Acephala macrosclerotiorum* sp. nov., a close relative of *Phialocephala fortinii*. *Mycorrhiza* 7: 481-492.
- Nelson E. E., Pearce N. H., Malajczuk N. 1989. Competitive colonization of karri (*Eucalyptus diversicolor*) stem sections by *Armillaria luteobubalina* and *Trichoderma* spp. *Proceedings of 7th International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees*. 79-83.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2002. *Mikrobiologia*. Krótkie wykłady. PWN, Warszawa.
- Niewolak S., Brzozowska R., Czechowska K., Filipkowska Z., Korzeniewska E. 2007. Sezonowe zmiany liczebności promieniowców i grzybów (nitkowatych i drożdżoidalnych) w wodzie, glebie i roślinności śródleśnych mokradeł w okolicy Olsztyna. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 7 (2a): 271-291.
- Onsando J. M., Waudu S. W. 1994. Interaction between *Trichoderma* species and *Armillaria* root rot fungus of tea in Kenya. *International Journal of Pest Management* 40: 69-74.

- Pitt J. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, New York.
- Reaves J. L., Shaw C. G., Mayfield J. E. 1990. The effects of *Trichoderma* spp. isolated from burned and non-burned forest soils on the growth and development of *Armillaria ostoyae* in culture. Northwest Science 64: 39-44.
- Saito K., Nishida K. M., Mori T., Kawamura Y., Miyoshi K., Nagami T., Siomi H., Siomi M. C. 2006. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. Genes 20: 2214-2222.
- Sierota Z. 1976. Influence of acidity on the growth of *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. and on the inhibitory effect of its filtrates against *Fomes annosus* (Fr.) Cke in artificial cultures. European Journal of Plant Pathology 5: 302-311.
- Sierota Z., Kwaśna H. 1999. Ocena mikologiczna zmian zachodzących w glebie gruntu porolnego po dodaniu trocin iglastych. Sylwan 143 (4): 57-66.
- Singh P., Raghukumar Ch., Verma P., Shouche Y. 2012. Assessment of fungal diversity in deep-sea sediments by multiple primer approach. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 659-667.
- Szwajkowska-Michałek L., Kwaśna H., Łakomy P., Perkowski J. 2012. Inhibition of *Armillaria* and *Heterobasidion* growth by *Penicillium adametzii* isolated from *Pinus sylvestris* forest soil. Forest Pathology 42: 454-466.
- Viaud M., Pasquier A., Brygoo Y. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. Mycological Research 104: 1027-1032.
- Warcup J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature 166: 117-118.
- Warcup J. H. 1955. Isolation of fungi from hyphae present in soil. Nature 175: 953-954.
- Watanabe K., Kodama Y., Harayama S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. Journal of Microbiological Methods 44: 253-262.
- Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52 (suppl. 1): 487-511.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. [red.]. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California. 315-322.
- Xiao G., Berch S. M. 1995. The ability of known ericoid mycorrhizal fungi to form mycorrhizae with *Gaultheria shallon*. Mycologia 87: 467-470.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. Biology and Fertility of Soils 29: 111-129.