

JOLANTA BEHNKE-BOROWCZYK, HANNA KWAŚNA, MARTA BĘŁKA

Metody molekularne stosowane w badaniu różnorodności mikroorganizmów glebowych

Molecular methods used in studies of diversity of the soil microorganisms

ABSTRACT

Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H., Bęłka M. 2012. Metody molekularne stosowane w badaniu różnorodności mikroorganizmów glebowych. Sylwan 156 (4): 294-304.

Application of the correct methods of study is essential for a proper description and understanding of natural communities of microorganisms and their relationships. Classical methods used for detection and identification of soil microorganisms resulted in underestimation of the microbiota. It has been claimed that classical methods, based mainly on morphology, led to the identification of only 1% of the soil microbiota, usually species that predominate in culture because of their fast growth and abundant sporulation. Molecular methods allow rapid, accurate, sensitive and cost-effective identification and enumeration of microorganisms. They are designed to replace and/or support classical approaches. This review summarizes some of the current and emerging nucleic acid-based molecular approaches used for detection, discrimination and quantification of microbes in the environment, mostly in soil.

KEY WORDS

biodiversity, microbiota, molecular methods, soil

ADDRESSES

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

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

Marta Bęłka – e-mail: marta.belka@up.poznan.pl

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

Wstęp

Większość metod klasycznych stosowanych dotychczas w identyfikacji mikroorganizmów opierała się na ich izolacji (pozyskaniu ze środowiska naturalnego) i ustalaniu typowych cech morfologicznych i specyfiki zarodnikowania (tzw. morfotypowanie) obserwowanych w naturze lub w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*). Metody klasyczne wymagały najczęściej hodowli i obserwacji wzrostu kultur na podłożach mikrobiologicznych, często specyficznych dla konkretnej grupy mikroorganizmów. Zarodnikowanie typowe dla określonej grupy grzybów obserwowane było przy użyciu mikroskopu.

Efektom stosowania metod klasycznych było niedoszacowanie rzeczywistej frekwencji i różnorodności mikroorganizmów występujących w środowisku naturalnym. Twierdzi się, że umożliwiały one identyfikację około 1% mikroorganizmów glebowych [Torsvik, Øvreås 2002], najczęściej taksonów dominujących w środowisku ze względu na szybki wzrost i obfite zarodnikowanie. W przypadku grzybów były to najczęściej przedstawiciele gromad *Zygomycota* i *Ascomycota*. Metoda klasyczna zawodziła w detekcji i identyfikacji mikroorganizmów wolnorosnących, niezarodnikujących, niehodowlanych *in vitro* i morfologicznie podobnych. W przypadku grzybów są to najczęściej przedstawiciele gromady *Basidiomycota*.

Poznanie budowy DNA [Watson, Crick 1953] umożliwiło rozwój nauk biologicznych, które coraz powszechniej wykorzystują techniki biologii molekularnej oparte na analizie budowy kwasów rybonukleinowego (RNA) i dezoksyrybonukleinowego (DNA) lub białek. Techniki biologii molekularnej zostały wprowadzone do badań nad ekologią mikroorganizmów stosunkowo niedawno [Cooper, Rao 2006]. Z roku na rok mają jednak coraz większe zastosowanie w identyfikacji oraz ustalaniu frekwencji i różnorodności mikroorganizmów. Pozwalają na poznanie obfitości i różnorodności mikroorganizmów występujących w glebie, dzięki czemu przekonujemy się o rozmiarach zbiorowisk glebowych. Szacuje się, że 1 g gleby zawiera 3 000-11 000 genomów (=taksonów), czyli różnych organizmów.

Watson i Crick [1953], przedstawiając budowę DNA, oparli się na osiągnięciach Rosalind Franklin i Maurice'a Wilkina, którzy wykorzystali metodę krystalografii rentgenowskiej (=rejestracji widm dyfrakcyjnych promieni rentgenowskich). Umożliwiło to poznanie kształtu i budowy DNA, które składa się zwykle z dwóch nici, owijających się wokół wspólnej osi i tworzących tzw. podwójną helisę. Pojedynczy łańcuch DNA zbudowany jest z kolekcji czterech rodzajów nukleotydów. Nukleotyd składa się z cukru (ryboza w RNA i dezoksyryboza w DNA), jednej z zasad purynowych (adenina lub guanina) lub pirymidynowych (cytozyna lub tymina zastępowana przez uracyl w RNA) oraz reszty kwasu fosforowego. Zasady jednego łańcucha łączą się z zasadami drugiego za pomocą wiązań wodorowych, tworząc pary zasad. Adenina łączy się z tyminą, a guanina z cytozyną. Całość struktury podwójnej helisy utrzymywana jest przez szkielet cukrowo-fosforowy. Kolejność nukleotydów (charakteryzowanych przez zasadę) w łańcuchu DNA jest charakterystyczna dla danego organizmu.

Kwasy RNA i DNA znajdują się w każdym żywym organizmie. W strukturze DNA występującego w jądrach komórek zapisana jest informacja genetyczna. Materiał genetyczny zawarty w podstawowym (haploidalnym) zespole chromosomów to genom. Genom bakterii *Escherichia coli* ma 4,5 miliona par zasad. Dostępne w Internecie bazy danych (np. www.zbi.ce/fungal-genomesize/) podają wielkość genomu kilkuset rodzajów grzybów. Genom *Armillaria*, rodzaju patogenicznego dla drzew, ma $55-115 \times 10^6$ /C par zasad, w zależności od gatunku. Genomy roślin i zwierząt są blisko tysiąc razy większe. Wielkość DNA zawartego w podstawowym zespole chromosomów człowieka wynosi $3\,079 \times 10^9$ nukleotydów, a jego długość w pojedynczym jądrze komórki około 2 metrów. Na całym świecie trwają intensywne prace nad poznaniem budowy DNA mikroorganizmów, w tym grzybów, zwłaszcza gatunków patogenicznych dla roślin lub stosowanych w biotechnologii.

Geny decydują o cechach i możliwościach organizmu. Określony wygląd i określona funkcja organizmu jest wynikiem wykrycia kolejności kodonów (=trójek nukleotydów) w DNA przez antykodony (=trójki nukleotydów w RNA). Po rozpoznaniu indywidualnego kodonu, do syntetyzowanego w komórce białka przyłącza się jeden z obecnych w komórce 20 aminokwasów. Każdemu kodonowi DNA przyporządkowany jest inny aminokwas. Skład białka decyduje o wyglądzie i funkcji organizmu. W ten sposób powstaje informacja pierwszego rzędu. Informacja pierwszego rzędu jest jedyną informacją u roślin i prostych organizmów zwierzęcych, nieposiadających centralnego układu nerwowego. Nie ma ona jeszcze charakteru kognitywnego, tzn. nie jest informacją o czymś, lecz służy jedynie stwierdzeniu zaistnienia pewnego stanu własnego, który spośród stanów rozróżnianych przez jakiś detektor aktualnie wystąpił. Różnym stanom rozróżnianym przez detektor przyporządkowane są genetycznie różne cechy i zachowania układu.

Metody molekularne stosowane w detekcji mikroorganizmów glebowych

EKSTRAKCYJA DNA. Skuteczność i efektywność analizy molekularnej zależy od jakości wyekstrahowanego DNA. Wysoka jakość DNA warunkuje powodzenie badań nad pojedynczymi mikroorganizmami i ich zbiorowiskami w środowisku naturalnym. DNA powinien być czysty (niezanieczyszczony) i kompletny (niepofragmentowany). Jakość DNA zależy od sposobu jego ekstrakcji. Istnieją różnorodne metody ekstrakcji DNA z komórek organizmów żywych [Herrera, Cockell 2007]. Sposoby te różnią się zwłaszcza przygotowaniem próby, przeprowadzeniem dezintegracji ściany komórkowej i wydostania się zawartości komórek do środowiska (tzw. lizy) oraz oczyszczaniem kwasów nukleinowych.

Lizę można przeprowadzić mechanicznie, fizycznie, na drodze chemicznej lub enzymatycznej. Lizę mechaniczną przeprowadza się przemiennym użyciem wysokiej i niskiej temperatury (szok temperaturowy) lub tarcia (np. perełkami szklanymi). Liza fizyczna wykorzystuje użycie mikrofal lub ultradźwięków. Sposób chemiczny polega na zastosowaniu detergentów, fenolu i siarczanu dodecylsodowego. Lizę enzymatyczną przeprowadza się z użyciem enzymów litycznych, np. lizozymu, chitynazy, proteinazy K, pronazy. Dla ułatwienia ekstrakcji DNA z komórek mieszaninę lizującą wzbogaca się często związkami destabilizującymi działanie enzymów (dithiothreitol), inaktywującymi enzymy (kwas etylenodiaminotetraoctowy, który wiąże jony magnezu, bez których enzymy są nieaktywne), inhibitującymi enzymy (fenantrolina), ochraniającymi ekstrahowany DNA (poliwinylpirolidon, poliwinylolipirolidon), ułatwiającymi strącanie DNA (CaCl_2), rozpuszczającymi kwasy huminowe (Na_2HPO_4), strącającymi kwasy humusowe ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) [Robe i in. 2003; Herrera, Cockell 2007; Peršoh i in. 2008].

W efekcie ekstrakcji uzyskujemy kwas nukleinowy o różnym stopniu zanieczyszczenia białkami, polisacharydami, lipidami oraz składnikami mineralnymi. DNA z gleby, zwłaszcza z gleby leśnej, jest zanieczyszczony związkami próchnicznymi (bituminami i związkami humusowymi). Te ostatnie mają charakter kwasów humusowych (kwasy fulwowe, huminowe brunatne i szare, hymatomelanowe), humin i ulmin oraz związków organiczno-mineralnych (chelaty, kompleksy ilasto-humusowe). Obecność związków próchnicznych, nawet w niewielkiej ilości, może znacznie utrudnić lub uniemożliwić amplifikację, czyli powielanie łańcuchów DNA [Yu-Li, Olson 1992]. Powodują one inaktywację polimerazy, enzymu katalizującego amplifikację DNA oraz blokadę hybrydyzacji DNA, czyli procesu łączenia się komplementarnych nici kwasu nukleinowego w podwójną helisę. Oczyszczenie wyekstrahowanego DNA przeprowadza się najczęściej metodą strącania zanieczyszczeń octanem potasu, glikolem polietylenowym, etanolem, izopropanolem lub mieszaniną chloroformu z fenolem, stosowanych osobno lub w kombinacjach. DNA z gleby o dużej zawartości związków próchnicznych oczyszcza się mechanicznie przez filtrację w kolumnkach ze specjalną żywicą lub żelem (np. Wizard firmy Promega, Sephadex), wirowanie w obecności gradientu Nycodens lub sacharozy, CsCl, Percollu lub Ficollu [van Elsas i in. 1997; Cullen, Hirsch 1998], wychwytywanie DNA związkami chemicznymi, np. poliwinylpirolidonem lub mleczkiem szklanym (ang. glassmilk) oraz separacji w kolumnach do chromatografii jonowymiennej lub w żelu agarozowym na drodze elektroforezy. Różne typy gleb wymagają stosowania odmiennych procedur ekstrakcji kwasów nukleinowych zarówno na etapie lizy, jak i podczas oczyszczania DNA.

Ekstrakcja kwasów nukleinowych z gleby jest trudna również ze względu na wysokie zróżnicowanie gatunkowe jej mieszkańców oraz skłonność mikroorganizmów glebowych do adsorpcji na powierzchni koloidów glebowych. Liczne mikroorganizmy środowiska glebowego

należą do odległych grup taksonomicznych. Na ogół posiadają niewielkie rozmiary (najczęściej <0,5 µm) i charakteryzują się dużą niedostępnością, małą aktywnością metaboliczną i znaczną opornością na czynniki lityczne. Ściana komórkowa bakterii gramdodatniej (np. *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*), z uwagi na większą zawartość mureiny, ulega lizie trudniej niż ściana komórkowa bakterii gramujemnej. Około 75% mikroorganizmów glebowych jest zaadsorbowana na powierzchni koloidów glebowych. W efekcie ilość uwolnionego i ekstrahowalnego DNA nie przekracza na ogół 25% [Frostegård i in. 1999]. Ma to istotny wpływ na skład DNA z gleby, a to przekłada się na skład zbiorowisk organizmów glebowych.

Poszczególne procedury ekstrakcji DNA z gleby dają przeciętnie od kilku do kilkudziesięciu µg DNA z 1 g gleby. Niewłaściwie dobrana metoda lizy i oczyszczania prowadzi do utraty 80-90% DNA [Cullen, Hirsch 1998]. Uzyskane fragmenty DNA mają na ogół od 10 do 40 kilobaz (kb), co wystarcza do większości zastosowań. Do jednej reakcji amplifikacji DNA potrzeba 1-100 ng DNA. Wyekstrahowana ilość DNA wystarcza na ogół na ponad 1000 reakcji. Zdegradowanie (zanieczyszczenie i fragmentacja) DNA na ogół uniemożliwia jego amplifikację i dalszą analizę. Gotowe zestawy do izolacji DNA (tzw. kity) cieszą się obecnie coraz większą popularnością. Użycie kitu sprawia, że ekstrakcja DNA może być łatwiejsza, szybsza i mniej zawodna. Do izolacji DNA z gleby stosowane są kity wyprodukowane za granicą (PowerSoil® DNA Isolation Kit, Mo Bio, UltraClean Meg Prep Soil DNA, FastDNA R SPIN R, Soil Master™ DNA Extraction, Genomic Mini AX Soil) oraz w Polsce (A&A Biotechnology, Gdynia). Ilość ekstrahowanego DNA jest niewielka, ale wystarczająca dla dalszej amplifikacji [Steele, Streit 2006].

AMPLIFIKACJA KWAŚÓW NUKLEINOWYCH. Podstawową techniką biologii molekularnej jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR). Jest to metoda powielania łańcuchów DNA w warunkach laboratoryjnych, odbywająca się w sekwencji wielokrotnego podgrzewania i schładzania próbki. Technika ta została wynaleziona w 1983 roku przez Kary Mullisa [Rabinow 1996]. PCR wymaga obecności matrycy ssDNA, czyli odcinka DNA, który da początek replikacji, starterów, wolnych trójfosforanów nukleotydów, polimerazy DNA (np. Taq), buforu i wody. Startery są krótkimi (15-30 pz) jednoniciowymi fragmentami DNA o znanej sekwencji nukleotydów, które przyczepiają się do matrycy DNA, definiując fragment do amplifikacji. Trójfosforany nukleotydów dostarczają materiału do syntezy nici komplementarnej. Polimeraza DNA katalizuje syntezę nici komplementarnej, polegającej na wydłużaniu startera przez dobudowywanie nukleotydów komplementarnych do matrycy na jednym końcu startera. Bufor poprawia specyficzność i wydajność amplifikacji. Woda zapewnia właściwe środowisko dla działania polimerazy Taq.

W praktyce reakcja PCR przebiega w termocyklerze, czyli bloku grzejnym, w którym elektronicznie dochodzi do precyzyjnej i szybkiej zmiany temperatury wymaganej przez poszczególne etapy procesu. Odbywa się ona w trzech, cyklicznie powtarzających się etapach denaturacji, przyłączania starterów i syntezy. Denaturacja polega na rozplątaniu dwóch nici helisy DNA i odbywa się w temperaturze 90-95°C. Przyłączanie starterów do pojedynczych łańcuchów DNA wymaga temperatury 40-65°C. Synteza polega na dobudowywaniu nici komplementarnej i zachodzi w temperaturze 72°C. Po 30 cyklach wyjściowa ilość DNA wzrasta milion razy. Pozwala to uzyskać 0,2-2,0 µg określonego fragmentu DNA. Termostabilność polimerazy w zakresie 37-94°C zapobiega nieodwracalnemu zniszczeniu enzymu podczas denaturacji DNA. Amplifikacja kończy się po wyczerpaniu składników lub po przeprowadzeniu ustalonej wcześniej liczby cykli. Wielkość produktu PCR sprawdzamy na żelu agarozowym (fot. 1). Niektórymi odmianami reakcji PCR są:

- reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR), w której stosuje się nukleotydy znakowane fluorochromami lub sondy molekularne (krótkie odcinki DNA) łączące się z matrycowym DNA,
- reakcja odwrotnej transkryptazy (ang. reverse-transcription, RT-PCR), która polega na początkowej syntezie DNA na matrycy mRNA, odbywającej się przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy i dalszej amplifikacji DNA w zwykłej reakcji PCR,
- gniazdowa PCR (ang. nested-PCR), która polega na początkowej syntezie kilku długich fragmentów DNA zawierających pożądany odcinek i dalszej amplifikacji požądanego odcinka z drugą parą starterów,
- multipleksowa real-time PCR (ang. multiplex PCR), która prowadzona jest równocześnie z kilkoma parami starterów specyficznych dla różnych genów.

Metoda real time PCR zyskała szersze uznanie dzięki mniejszej pracochłonności, większej czystości, szybkości, czułości i wiarygodności. Aktualnie wprowadzana jest tzw. amplifikacja sterowana transkrypcją TMA (ang. transcription-mediated amplification), która polega na amplifikacji RNA lub DNA generowanej dwoma enzymami, polimerazą RNA i odwrotną transkryptazą. Produkt amplifikacji identyfikowany jest w reakcji luminescencyjnej z sondą.

Do badania grzybów wykorzystuje się często geny rybosomalnego RNA, zwłaszcza zespół kodujący trzy podjednostki rRNA. Obejmuje on trzy geny (18S; 5,8S; 28S), dwie wewnętrzne sekwencje transkrybowane (ang. internal transcribed spacer; ITS 1 i ITS 2) oraz dwie zewnętrzne sekwencje transkrybowane (ETS 1 i ETS 2). ITS 1 i ITS 2 występują w komórkach w stosunkowo dużej obfitości, należą do umiarkowanie zmiennych i są przydatne do identyfikacji gatunkowej. Wykorzystuje się również rybosomalną sekwencję międzygenową odcinka IGS (ang. intergenic spacer) [White i in. 1990; Prosser 2002]. Obecnie coraz częściej wykorzystuje się geny kodujące białka. Wymienione fragmenty RNA amplifikuje się przy użyciu starterów, które mogą być uniwersalne (stosowane m.in. do amplifikacji regionów zmiennych u gatunków, rodzajów, np. rRNA ITS 1/2) lub specyficzne dla pojedynczego gatunku.

IDENTYFIKACJA MIKROORGANIZMÓW. Identyfikację mikroorganizmów wykonuje się na drodze analizy podobieństwa badanego obiektu z wzorcem z bazy danych, posługując się metodami będącymi modyfikacją PCR (np. RAPD), produktami PCR (np. DGGE, TGGE, SSCP, RISA, ARISA, sekwencjonowanie) oraz aktywnością enzymów restrykcyjnych (endonukleaz), które rozpoznają specyficzne sekwencje w amplifikowanym DNA i przecinają (trawią) cząsteczkę DNA (np. RFLP, T-RFLP, AFLP, ARDRA).



Fot. 1.

Rozdział elektroforetyczny produktu PCR 28 izolatów grzybów glebowych
Electrophoresic sequencing of PCR product id 28 soil fungi isolates

Produkty PCR lub fragmenty DNA powstałe po trawieniu można rozdzielić na żelach metodą elektroforezy i wizualizować po barwieniu DNA. Obecność ujemnie naładowanych reszt kwasu fosforowego (PO_4^-) w cząsteczkach nukleotydów sprawia, że DNA posiada ładunek ujemny. W żelach agarozowych lub poliakrylamidowych, w polu elektrycznym, DNA migruje w kierunku dodatnim. Szybkość migracji zależy od kształtu i wielkości fragmentu DNA i jest odwrotnie proporcjonalna do masy cząsteczkowej DNA. Dłuższe i cięższe fragmenty DNA przemieszczają się wolniej od fragmentów krótszych i lżejszych. Na żelu obserwujemy je w postaci prążków, w których znajdują się cząsteczki DNA o różnej sekwencji nukleotydów. Prążki obecne są na różnej wysokości. Tworzą one wzór prążkowy, tzw. „odcisk palca” (ang. DNA fingerprint).

W losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (ang. Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) stosuje się jeden krótki starter zawierający 5-15 nukleotydów z dużą zawartością zasad G i C. Niska temperatura dwóch pierwszych cykli amplifikacji (35-45°C) sprzyja przyłączeniu startera do niekoniecznie homologicznych sekwencji matrycowych. Starter przyłącza się do obu nici DNA w wielu miejscach, generując powstanie od kilku do kilkunastu produktów amplifikacji. Podobieństwo wzorów prążkowych pozwala na ocenę pokrewieństwa badanych szczepów.

Elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) polega na zastosowaniu bogatych w zasady G i C starterów uniwersalnych. Przeprowadzana jest amplifikacja DNA, a następnie jego rozdział na żelu o wzrastającym stężeniu związku denaturującego (formamid, mocznik). Stężenie czynnika wzrasta wraz ze wzrostem odległości od miejsca umieszczenia prób. Czynnikiem denaturującym powoduje rozplątanie podwójnej helisy DNA. Pojedyncze nici tracą mobilność i przemieszczanie DNA w żelu zostaje gwałtownie przyhamowane. Tworzy się prążek. Moment denaturacji DNA zależy od budowy DNA charakterystycznej dla gatunku; jedne fragmenty ulegają denaturacji przy niższym stężeniu czynnika denaturującego, inne przy wyższym. Podobną metodą jest elektroforeza w gradiencie temperatury (ang. Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE). Czynnikiem denaturującym jest temperatura. Wadą metod DGGE i TGGE jest możliwość wykrywania gatunków dominujących [MacNaughton i in. 1999]. Teoretycznie pojedynczy pasek powinien reprezentować pojedynczy gatunek. W praktyce jednak zdarza się, że jeden gatunek może na żelu być reprezentowany przez kilka prążków, a jeden prążek może reprezentować więcej niż jeden gatunek. To ostatnie jest wynikiem podobieństwa w budowie wykorzystwanego fragmentu RNA (np. 16S rRNA) u różnych gatunków mikroorganizmów [Gelsomino i in. 1999; Maarit-Niemi i in. 2001].

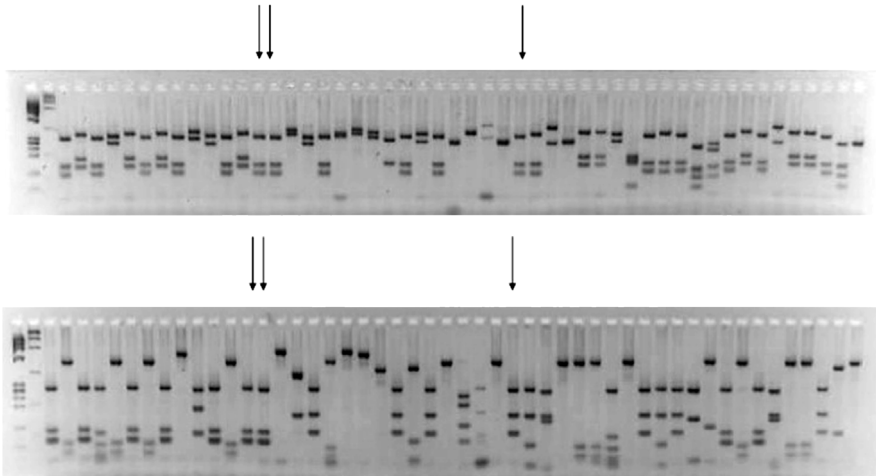
Badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA (ang. Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) bazuje na technice, w której zamplifikowany DNA poddawany jest denaturacji termicznej i chemicznej (zagotowanie próby i jej szybkie schłodzenie w buforze obciążającym, zawierającym czynnik denaturujący, np. formamid). Obie pojedyncze nici DNA przyjmują właściwą dla sekwencji strukturę przestrzenną. Zmiany w budowie wpływają na szybkość poruszania się nici w trakcie elektroforezy na niedenaturujących żelach poliakrylamidowych. Fragmenty o takiej samej długości, ale różnej sekwencji, różnią się szybkością migracji (ruchliwością elektroforetyczną). Różne sekwencje dają różne wzory prążkowe. Metoda ta w założeniu powinna wykryć już pojedynczą różnicę w sekwencji nukleotydów. W praktyce umożliwia wykrycie 95% zmian dla fragmentów o długości 300-450 pz [Napierała i in. 2004]. SSCP ma te same ograniczenie co DGGE. Pojedynczo skręcone DNA może formować więcej niż jedną stabilną konformację, tj. przyjmować różny kształt przestrzenny, w wyniku czego jedna sekwencja może być reprezentowana przez więcej niż jeden prążek na żelu.

Analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych (ang. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, RISA) i automatyczna analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych (ang. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, ARISA) wykorzystuje region IGS. Jest on amplifikowany techniką PCR, denaturowany i rozdzielany na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturacji. W RISA sekwencje polimorfizmu wykrywane są po barwieniu srebrem, a w ARISA końcowy starter jest znakowany fluorescencyjnie i wykrywany automatycznie.

Sekwencjonowanie DNA (ang. sequencing) to technika odczytywania sekwencji, czyli kolejności par nukleotydów w helisie DNA. Jest najbardziej czułą techniką wykrywania zmian w materiale genetycznym, umożliwiającą jednocześnie jego pełną charakterystykę. Dotychczas stosowano metodę Sanger, która składała się z kilku etapów. W fazie preparatywnego PCR amplifikacji wybranego fragmentu DNA dokonywano przy użyciu pary starterów specyficznych. W asymetrycznym PCR następowała osobna amplifikacja z każdym ze starterów z zastosowaniem specyficznych dideoksynukleotydów (ddNTP), z których każdy znakowany był fluoroforem o innym kolorze. W wyniku zatrzymania syntezy kopii matrycy tworzą się wszystkie możliwe, różniące się długością, komplementarne do matrycy oligonukleotydy, które zawierają na 3'-końcu specyficzne i różnokolorowe fluorofory ważne dla detekcji. Etap elektroforezy na denaturującym żelu poliakrylamidowym stosowano od najkrótszego do najdłuższego oligonukleotydu w celu ustalenia kolejności nukleotydów. Na zakończenie analizowano otrzymane wyniki przy użyciu pakietu programów komputerowych. Metoda cyklicznego sekwencjonowania DNA (ang. cycle sequencing) umożliwia bezpośrednią analizę produktu reakcji PCR.

Coraz częściej stosuje się sekwencjonowanie nowej generacji, takie jak pirosekwencjonowanie metodą 454, sekwencjonowanie poprzez ligację (SOLID, ABI) oraz sekwencjonowanie przez hybrydyzację. Pirosekwencjonowanie metodą 454 jest techniką działającą poprzez syntezę. Wykorzystuje specyficzny zestaw enzymów pozwalający na prowadzenie sekwencjonowania w czasie syntezy łańcucha DNA. Metoda 454 umożliwia prowadzenie wielu sekwencjonowań w tym samym czasie (sekwencjonowanie równoległe), co przyspiesza proces analizy. Sekwencjonowanie poprzez ligację stanowi technikę wykorzystującą ligazę DNA do identyfikacji i lokalizacji nukleotydu. Sekwencjonowanie przez hybrydyzację stanowi zbiór metod wykorzystujących hybrydyzację jednej nici DNA do drugiej nici komplementarnej. W przypadku oligonukleotydów umożliwia detekcję nawet pojedynczej, nieskojarzonej zasady. Jedną z dróg sekwencjonowania przy użyciu tej metody jest wykorzystanie mikromacierzy DNA zawierających krótkie fragmenty DNA oraz wiele ich wariacji sekwencyjnych.

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) wykorzystuje różnice w budowie sekwencji DNA. DNA jest trawiony za pomocą enzymów restrykcyjnych. Zmiana w budowie sekwencji odcinka rozpoznawanego przez enzym powoduje, że dokona on rozcięcia DNA. Rozcięcie odbywa się najczęściej w kilku miejscach. W efekcie w dwóch różnych próbach powstanie różna ilość fragmentów DNA, będących produktami cięcia pierwotnej cząsteczki. Fragmenty te różnią się wielkością i ciężarem. Na żelu układają się na różnej wysokości, w zależności od ich masy cząsteczkowej (fot. 2) [Kaczmarek i in. 2004]. Obecność lub brak prążka o określonej wielkości świadczy o polimorfizmie. Polimorfizm może wynikać ze zmiany pojedynczego nukleotydu w obrębie miejsca restrykcyjnego, ze zmiany większych fragmentów DNA lub też z metylacji (przyłączanie grupy metylowej (-CH₃) w DNA). Najczęściej stosuje się od 2 do 4 enzymów [Tiedje i in. 1999], z których każdy daje inny układ prążków [Osborn i in. 2000]. Jeden gatunek mikroorganizmu może posiadać od jednego do kilku miejsc restrykcyjnych i może dawać różny układ prążków. Zastosowanie sześćozasadowych (zamiast czterozasadowych) enzymów restrykcyjnych przyczyni-



Fot. 2.

Rozdział elektroforetyczny DNA grzybów glebowych po RFLP

Electrophoresic sequencing of soil fungi DNA in RFLP

Strzałkami oznaczono poszczególne próby. W wyniku trawienia enzymem HhaI, na górnym żelu wszystkie trzy próby mają jednakowy wzór prążkowy sugerujący, że reprezentują jeden gatunek grzyba. W wyniku trawienia enzymem BsuRI, na dolnym żelu dwie pierwsze próby mają jednakowy wzór prążkowy, różny od wzoru próby trzeciej, co oznacza, że pierwsze dwie i trzecia próba reprezentują dwa różne gatunki grzybów.

Arrows indicate individual samples. Upper gel – defragmentation with HhaI enzyme, all samples exhibit the same pattern, which suggests that they represent one fungi species, lower gel – defragmentation with BsuRI enzyme, pattern of the first two samples differs from the third one, which suggests that samples represent two various fungi species.

nia się do zmniejszenia liczby fragmentów restrykcyjnych dla jednego gatunku. Z kolei polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (ang. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) jest metodą podobną do klasycznej RFLP. Różnica polega na zastosowaniu startera PCR znakowanego barwnikiem fluorescencyjnym. W efekcie analizujemy znakowane terminalne fragmenty restrykcyjne. Uproszczony wzór prążków umożliwia kompleksową analizę populacji. Każdy prążek reprezentuje pojedynczą jednostkę taksonomiczną. Wzór prążków może być użyty do badania bogactwa i różnorodności gatunkowej oraz podobieństwa między próbkami. Różne enzymy mogą produkować różne wzory. Konieczne jest zastosowanie 2-4 enzymów. Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) polega na badaniu efektu amplifikacji specyficznych fragmentów restrykcyjnych. Wymaga małej ilości materiału wyjściowego. Wykorzystuje dwa enzymy restrykcyjne, z których jeden charakteryzuje się wyższą, a drugi niższą częstotliwością cięcia. Do fragmentów restrykcyjnych dołączane są adaptory składające się z sekwencji rdzeniowej oraz sekwencji specyficznej dla miejsca restrykcyjnego. W dalszym etapie następuje amplifikacja fragmentów restrykcyjnych i ich rozdział na żelu poliakrylamidowym. Analiza restrykcyjna powielonego rDNA (ang. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA) jest metodą podobną do RFLP, lecz wykorzystuje rybosomalny DNA.

Hybrydyzacja z sondami molekularnym obejmuje tworzenie stabilnych struktur dwuniciowych kwasów nukleinowych z pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych o wzajemnie komplementarnych sekwencjach. Wyizolowany z badanego materiału DNA lub RNA unieruchamiany jest na nylonowych lub nitrocelulozowych błonach w formie plam (ang. dot blotting). Wprowadza się sondę molekularną (cDNA). Detekcja sygnału świadczy o rozpoznaniu przez sondę komplementarnej sekwencji nukleotydowej. Możliwa jest sytuacja odwrotna, kiedy to

sonda jest unieruchomiona na trwałym podłożu, a badany materiał dodawany jest w roztworze hybrydazyjnym (np. w mikromacierzach DNA, chipach DNA, ang. DNA microarray). Służą to do identyfikacji mikroorganizmów i badania ekspresji genów.

Podsumowanie

Metody opisane w niniejszej pracy wykorzystywane są do izolacji, identyfikacji i analizy licznych patogenów drzew, w tym grzybów zgorzelowych z rodzaju *Rhizoctonia* (teleomorfy: *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*) występujących m.in. w glebach szkółek leśnych. Zastosowanie losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD) oraz badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) pozwoliło rozróżnić czternaście grup (AG-1 – AG-13 i AG-B1) oraz wiele podgrup w ośmiu grupach anastomozowych u ponad 200 izolatów *Rhizoctonia* pochodzących z różnych stref geograficznych i roślin-gospodarzy [Duncan i in. 1993; Toda i in. 1999; Guillemaut i in. 2003; Carling i in. 2002] oraz zidentyfikować nowe grupy anastomozowe (AG-T i AG-U) u dwujędrowych gatunków *Rhizoctonia* [Hyakumachi i in. 2005]. Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR) umożliwia coraz powszechniejszą analizę ilościową, czyli określenie udziału *Rhizoctonia* lub udziału jego różnych grup anastomozowych w zbiorowisku mikroorganizmów [Sayler, Yang 2007; Okubara i in. 2008]. Sayler i Yang [2007] proponują wykorzystanie real-time PCR również do określania agresywności *R. solani* J.G. Kühn i oceny poziomu odporności porażanych roślin na tego patogena. Zastosowanie klonowania środowiskowego DNA i sekwencjonowania klonów umożliwiło określenie udziału *Rhizoctonia* w zbiorowisku grzybów w korzeniach sosny zwyczajnej z objawami zgorzeli [Kwaśna, Bateman 2009]. Korzenie z umiarkowanymi objawami zgorzeli, poza *R. solani* zasiedlone były również przez *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Neonectria radicularia* (Gerlach & L. Nilsson) Chaverri & C. Salgado i *Pythium* spp. (50% klonów). Korzenie z silnymi objawami zgorzeli zasiedlone były głównie przez *R. solani*. (80% klonów). Zastosowanie reakcji odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) umożliwiło badanie przemieszczania się kwasów nukleinowych u niekompatybilnych (różnych genetycznie) izolatów *R. solani*, skutkujących powstawaniem nowych ras patogena [Charlton, Cubeta 2007].

Literatura

- Carling D. E., Baird R. E., Gitaitis R. D., Brainard K. A., Kuninaga S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92: 893-899.
- Charlton N., Cubeta M. A. 2007. Transmission of the M2 double-stranded RNA in *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3 (AG-3). *Mycologia* 99: 859-867.
- Cooper J., Rao J. 2006. *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. CAB International, Wallingford.
- Cullen D., Hirsch P. 1998. Simple rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 983-993.
- Duncan S., Barton J. E., O'Brien P. 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycological Research* 97: 1075-1082.
- van Elsas J., Mäntynen V., Wolters A. 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils* 24: 188-195.
- Frostegård Å., Courtis S., Ramisse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. 1999. Quantitation of bias related to the extraction of DNA directly from soil. *Applied Environmental Microbiology* 65: 5409-5420.
- Gelsomino A., Kiejzer-Wolters A., Cacco G., van Elsas J. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38: 1-15.
- Guillemaut C., Edel-Hermann V., Camporota P., Alabouvette C., Richard-Molard M., Steinberg C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 556-568.

- Herrera A., Cockell C. 2007. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods* 70: 1-12.
- Hyakumachi M., Kubota A., Fukui H. 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U, of binucleate *Rhizoctonia* spp. causing rot and stem rot of cut-flower and miniature roses. *Phytopathology* 95: 784-792.
- Kaczmarek M., Napierała D., Słomski R. 2004. Przykłady analiz DNA. W: Słomski R. [red.]. Wykrywanie mutacji i polimorfizmu metodą PCR-RFLP. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. 90-94.
- 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: 239-248.
- Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods* 45: 155-165.
- MacNaughton S., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y.-J., White D. C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3566-3574.
- Napierała D., Kaczmarek M., Kalak R. 2004. Przykłady analiz DNA W: Słomski R. [red.]. Wykrywanie mutacji punktowych i polimorfizmu DNA metodą SSCP. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. 95-101.
- Okubara P. A., Schroeder K. L., Paulitz T. C. 2008. Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 98: 837-847.
- Osborn A., Moore E., Timmins K. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2: 39-50.
- Peršoh D., Theuerl S., Buscot F., Rambold G. 2008. Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *Journal of Microbiological Methods* 75: 19-24.
- Prosser J. 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganism. *Plant and Soil* 244: 9-17.
- Rabinow P. 1996. Making PCR: A Story of Biotechnology. The University of Chicago Press.
- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T., Simonet P. 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* 39: 183-190.
- Sayler R. J., Yang Y. 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. *Plant Disease* 91: 1663-1668.
- Steele H., Streit W. 2006. Metagenomics for the study of soil microbial communities. W: Cooper J., Rao J. [red.]. Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis. CBA International, Wallingford. 42-54.
- Tiedje J. M., Asuming-Brempong S., Nüsslein K., Marsh T. L., Flynn S. J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13:109-122.
- Toda T., Hyakumachi M., Suga H., Kageyama K., Tanaka A., Tani T. 1999. Differentiation of *Rhizoctonia* AG-D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analyses. *European Journal of Plant Pathology* 105: 835-846.
- Torsvik V., Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 40-245.
- Watson J., Crick F. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737-738.
- White T. J., Bruns T. D., 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. San Diego, California: Academic Press. 315-322.
- Yu-Li T., Olson B. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soil and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 754-757.

SUMMARY

Molecular methods used in studies of diversity of the soil microorganisms

Current microbiology involves use of a wide range of molecular methods in the detection of microorganisms. Molecular diagnostic methods have potential advantages in sensitivity, specificity, rapidity and cost-effectiveness compared with other methods. They are easy to use and amenable to automation. Their application is increasing our knowledge of microbial density, diversity and activity in habitats that include soil, where diversity seems to be greater than

expected. The apparently wide range of microorganisms that occurs has a density estimated at 3,000-11,000 genomes (=species) per 1g of soil. This review presents the molecular methods most often used for detection, discrimination and quantification of microbes in environmental samples. Knowledge of the actual structure of a microbial community helps in understanding the natural and spontaneous relationships between different components within a habitat (such as soil) and can provide a basis for manipulating relationships for the benefit of plants and for the safety of humans and the environment. The application of molecular methods has great potential for increasing our understanding in more general areas of environmental microbiology, with further implications for land management, agriculture and forestry improvement, and biotechnology.