

Techniki sekwencjonowania nowej generacji stosowane w badaniach nad wpływem grzybów na wietrzenie biologiczne

Anna Marzec-Grządziel¹, Anna Gałązka¹, Jarosław Grządziel, Łukasz Pawlik²

¹ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, agrzdziel@iung.pulawy.pl
² Instytut Nauk o Ziemi 41-200 Sosnowiec, ul. Będzińska 60, Uniwersytet Śląski

Badania wykonano w ramach projektu: NCN 2019/33/B/ST10/01009

Naturalne ekosystemy leśne to wielowarstwowe zwarte zbiorowiska roślinne, w których dominującą formacją są drzewa. Ze względu na wiele funkcji, jakie pełnią lasy, ważne jest utrzymanie ich zróżnicowanego składu gatunkowego. Jednym z podstawowych elementów siedlisk leśnych jest gleba, której kluczowym elementem są mikroorganizmy, stanowiące nieodłączną część środowiska i pełniące w nim szereg pozytywnych funkcji. Analiza wskaźników aktywności biologicznej gleb w celu oceny ich jakości jest powszechnie stosowana, zwłaszcza w odniesieniu do gleb użytkowanych rolniczo. Różnorodność genetyczna mikroorganizmów w glebie może być analizowana w celu poznania ogólnej lub dogłębnej struktury mikrobiologicznej danego ekosystemu. Metody sekwencjonowania następnej generacji są stosowane w celu poznania ogólnej struktury społeczności mikrobiologicznej i wszelkich zachodzących w niej zmian. W środowisku leśnym wskaźniki te są obecnie wykorzystywane w bardzo ograniczonym zakresie. Nie ma wystarczającej wiedzy na temat charakterystyki jakościowej i ilościowej bakterii obecnych w glebie siedlisk leśnych.

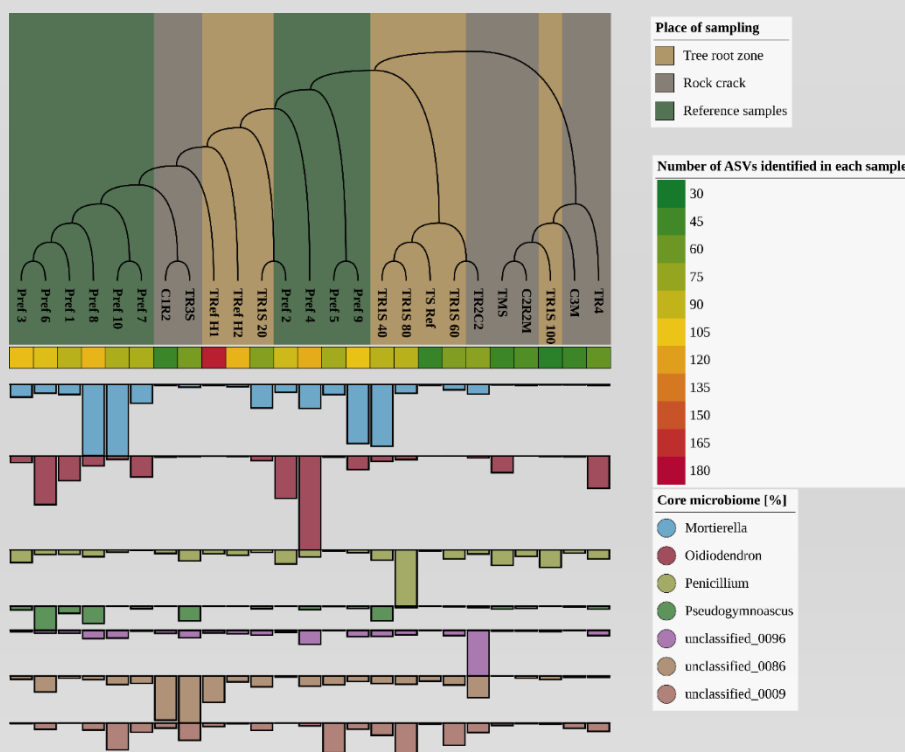
Głównym celem badań była ocena wpływu grzybów występujących w środowisku na proces wietrzenia biologicznego. Obszar poboru próbek znajdował się w przelomie rzeki Poprad w południowej części Beskidów. Próbki gleby pobrano w 2021 roku. Próbki gleby pobrano w październiku 2020 roku z trzech typów miejsc: 1) strefa korzeniowa drzew, 2) szczeliny skalne, 3) miejsce referencyjne (Rysunek 2, Tabela 1).

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

- Pakiet DADA2 v.1.8 (Callahan i in., 2016) w R v.3.4.3 (R Core Team, 2016) – uzyskanie wariantów sekwencji amplikonów (ASVs)
- Baza Unite, klasyfikator Naïve Bayesian Classifier (Wang i in., 2007) – przypisanie taksonomii
- Pakiet microeco (v.0.7.1) (Liu i in., 2021) – analiza wskaźników bioróżnorodności alfa, analiza LEfSe, analizy korelacji, analiza RDA
- PICRUSt 2.0, system linux – profil funkcjonalny zbiorowisk grzybów

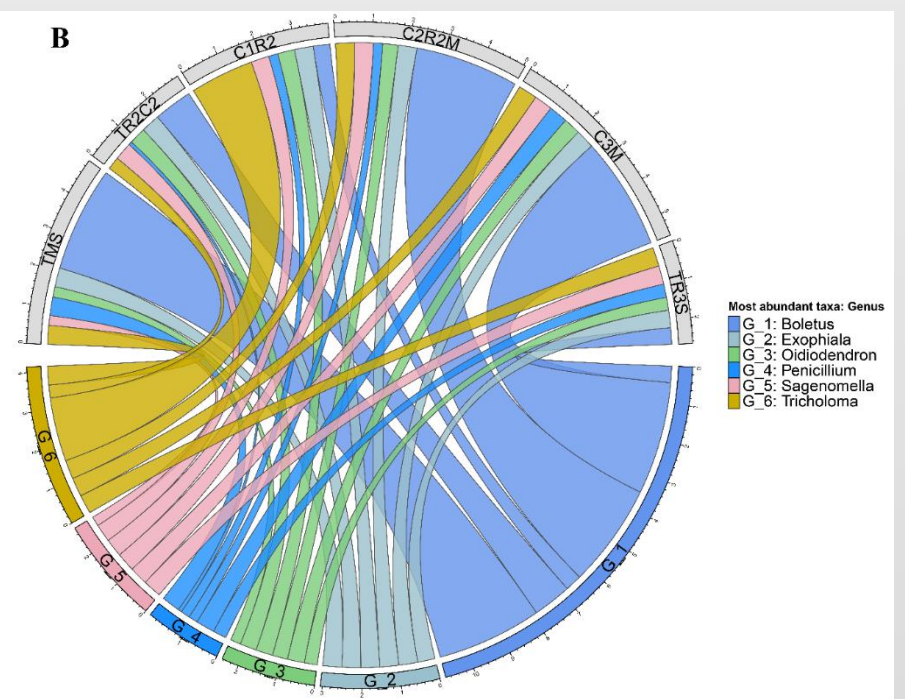
Analiza danych z sekwencjonowania grzybów wykazała obecność 304 wariantów sekwencji amplikonów (ASVs) należących do 200 różnych taksonów na poziomie rodzaju, z których nie udało się sklasyfikować 96 ASV.

Najliczniej występującymi taksonami na poziomie typu były Basidiomycota, następnie Ascomycota i Mortierellomycota. Mikrobiom rdzeniowy grzybów reprezentował 7 ASVs (Ryc.1). Analiza bioinformatyczna poszczególnych próbek wykazała obecność 77 unikalnych grzybowych ASVs, z których największą liczbę stwierdzono w próbce T_Ref_H1 (47 ASVs, 27,485% próbek). Analizowana spulowanych próbek (szczelina skalna, strefa korzeniowa, próby referencyjne) ujawniła obecność 137 unikatowych ASVs, z których najwięcej obecne było w próbkach strefy korzeniowej. Mikrobiom rdzeniowy stanowiło 92 ASVs.



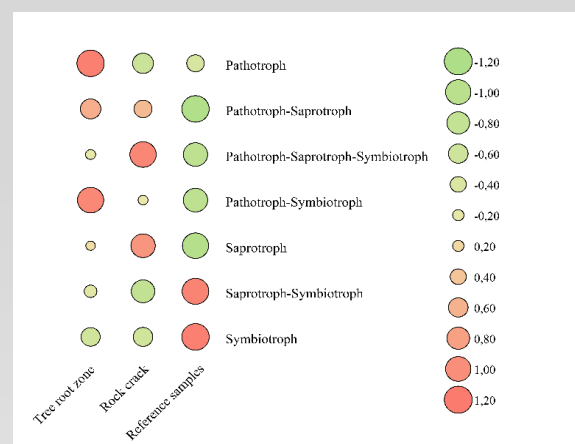
Ryc.1 Drzewo filogenetyczne oparte na analizie metataksonomicznej genu ITS rRNA. Mapa ciepła przedstawia liczbę ASV zidentyfikowanych w każdej próbce, wykres słupkowy przedstawia częstość występowania taksonów z podstawowego rodzaju w każdej próbce [%]

Najliczniejszymi taksonami na poziomie rodzaju występującymi w próbkach pobranych ze strefy korzeniowej drzew były: *Boletus*, *Discosia*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudotomentella*, *Tricholoma* i *Wilcoxina*. W próbkach ze szczeliny skalnych były to: *Boletus*, *Exophiala*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Sagenomella* i *Tricholoma* (Ryc.2).



Ryc.2 Chord diagram na podstawie analizy metataksonomicznej genu ITS rRNA dla próbek pobranych ze szczeliny skalnej. Górna część diagramu przedstawia symbole próbek. Dolna część diagramu przedstawia zidentyfikowane rodzaje występujące w analizowanych próbkach średnio w ponad 2%

Największą średnią liczbę sklasyfikowanych rodzajów stanowiły grzyby pełniące jednocześnie funkcje patotrofu, saprotrofu i symbiotrofu (25,229% wszystkich próbek). Patotrofy stanowiły średnio 0,272% każdej próby, saprotrofy - 9,487%, a symbiotrofy - 13,006%. Próbki pobrane ze strefy korzeniowej drzew i szczeliny skalnej charakteryzowały się najwyższym składem grzybów z funkcją patotrofów, saprotrofów i symbiotrofów (24,263%, 52,037%). W próbkach referencyjnych pobranych z miejsc bez objawów wietrzenia biologicznego najliczniej występowały grzyby o funkcji symbiotroficznej (31,601%) (Ryc. 3).



Ryc.3 Mapa ciepła przedstawiająca funkcje sklasyfikowanych rodzajów. Wyniki przedstawiają próbki spulowane w oparciu o miejsce poboru. Dane przedstawione na wykresie są normalizowane i skalowane.