

Bakterie symbiotyczne roślin z terenów nieuprawianych rolniczo jako źródło genów i funkcji metabolicznych przydatnych w promowaniu wzrostu roślin



Magdalena Wójcik, Piotr Koper, Kamil Żebracki, Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wprowadzenie i cel pracy

Globalny wzrost liczby ludności wymusza zwiększanie produkcji roślin. Poprawę produktywności plonów można osiągnąć m. in. poprzez zwiększenie tolerancji roślin na niekorzystne warunki. Ważnym elementem tej strategii jest promowanie korzystnych relacji rośliny-mikroorganizmy. Symbiotyczne rizobia będąc ważnym składnikiem mikrobiomu ryzosfery rośliny bobowatych, wykorzystywanych do produkcji żywności dla ludzi jak i pasz zwierzęcych, uniezależniają je od nawożenia azotowego.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że rizobia wyizolowane z roślin rosnących na nieuprawianych rolniczo terenach, mogą wykazywać pewne unikalne cechy metaboliczne, które nie uległy przekształceniu w skutek praktyk rolniczych. Takie bakterie lub ich aktywne metaboliczne geny mogą być użyteczne w perspektywie ich zastosowania w promowaniu wzrostu roślin.

Wyniki i wnioski

Punktem wyjścia do badań było profilowanie mikrobiomu gleby z ryzosfery roślin rosnących na nieuprawianych rolniczo terenach. Profilowanie oparto na analizie NGS zmiennego regionu V3-V4 16S rRNA w porównaniu do gleby rolniczej. Acidobacteria, Actinobacteria i Proteobacteria dominowały w obu badanych typach gleby ryzosferowej koniczyny, jednak ich proporcje były nieznacznie zmienione (Fig. 1A). Ponadto na poziomie rzędu, w ryzosferze koniczyny pochodzącej z gleby nieuprawianej rolniczo wykazano wyższą zawartość bakterii promujących wzrost roślin (PGPB) (Fig. 1B). Analiza statystyczna danych NGS potwierdziła wysoki stopień zróżnicowania mikrobiomu ryzosfery koniczyny rosnącej na gruntach rolnych (B1-B3) jak i nieuprawianych rolniczo (A1-A3), parametry te były porównywalne dla obu typów gleb (Tab. 1).

Następnie z brodawk korzeniowych koniczyny białej i koniczyny łąkowej (czerwonej) z terenów BPN (dla których wykonano profilowanie mikrobiomu) wyizolowano 15 szczepów oznaczonych odpowiednio KB3-KB12 i KC2-KC8. Analiza filogenetyczna sekwencji genu 16S rRNA oraz *nodA* potwierdziła przynależność badanych izolatów do rodzaju *Rhizobium*. Izolaty różniły się istotnie pod względem liczby i wielkości plazmidów (od 0.085 Mbp dla szczepu KB3 do 1.145 Mbp dla szczepów KC2, KC4, KC5, KC7).

Tabela 1. Statystyka odczytów sekwencji uzyskanych w analizie NGS profilowania mikrobiomu gleby ryzosferowej koniczyny z gleby uprawnej vs. rosnącej na terenach nieuprawianych. Dla każdego profilu mikrobiomu wykonano trzy powtórzenia biologiczne (A1-A3, B1-B3). 46.2% sekwencji wejściowych zostało przypisanych do jednostek OTUs i taksonów. W analizie zidentyfikowano łącznie 889 OTU, 100% wykrytych OTU zostało przypisanych do taksonów.

Mikrobiom ryzosfery koniczyny	Sample name	Liczba uzyskanych odczytów	Liczba strymowanych odczytów	Liczba odczytów po usunięciu sekwencji chimerycznych	Liczba sekwencji przypisanych do OTU	Liczba sekwencji przypisanych do taksonów	Chao1	Simpson	Shannon
Gleba rolna	A1	142741	142728	142202	67660	67660	42,2	0,892	3,242
	A2	117392	117378	117294	62174	62174	51,8	0,898	3,302
	A3	133225	133216	132867	55417	55417	41,2	0,890	3,222
Gleba nieuprawiana rolniczo	B1	154950	154933	154578	68491	68491	48,6	0,896	3,282
	B2	126259	126253	125933	53292	53292	47,6	0,894	3,262
	B3	135907	135896	135600	67351	67351	42,2	0,892	3,242

Fig. 1. Profil mikrobiomu gleby z ryzosfery koniczyny z terenów uprawianych (A1-A3) i nieuprawianych rolniczo (B1-B3), na poziomie gromady (A) i rzędu (B)

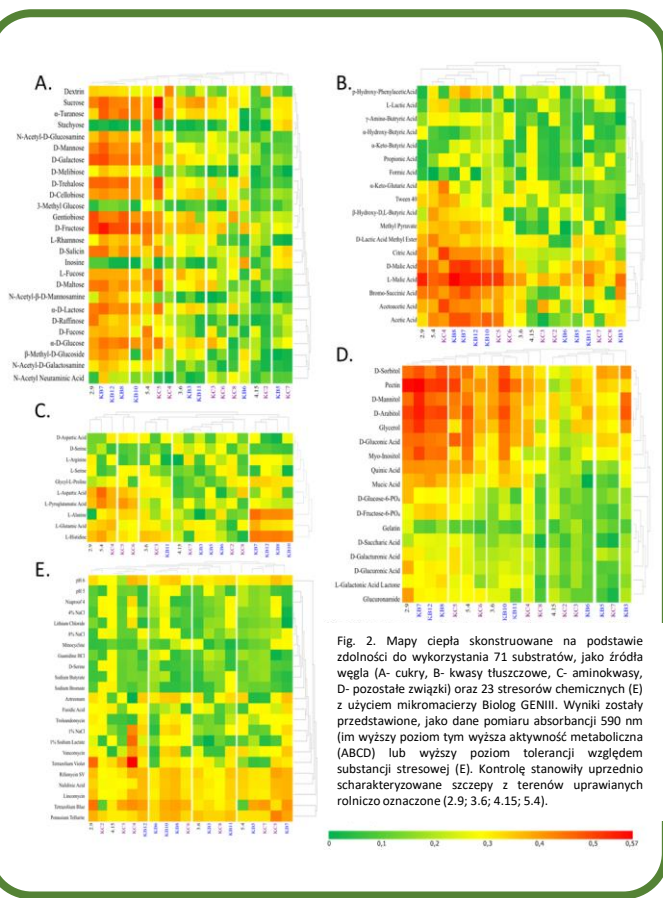
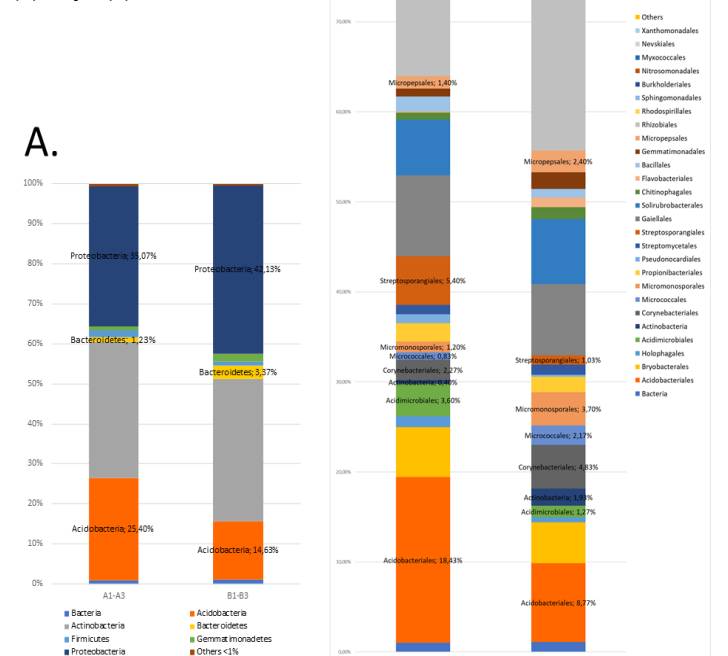


Fig. 2. Mapy ciepła skonstruowane na podstawie zdolności do wykorzystania 71 substratów, jako źródła węgla (A- cukry, B- kwasy tłuszczowe, C- aminokwasy, D- pozostałe związki) oraz 23 stresorów chemicznych (E) z użyciem mikromacierzy Biolog GENII. Wyniki zostały przedstawione, jako dane pomiaru absorbancji 590 nm (im wyższy poziom tym wyższa aktywność metaboliczna (ABCD) lub wyższy poziom tolerancji względem substancji stresowej (E)). Kontrolę stanowiły uprzednio scharakteryzowane szczepy z terenów uprawianych rolniczo oznaczone (2,9; 3,6; 4,15; 5,4).

Kluczowym etapem badań było wyznaczenie profilu metabolicznego izolatów, z wykorzystaniem mikromacierzy BiOLOG GEN III, które pozwalają określić zdolność wykorzystywania 74 różnych źródeł węgla oraz wrażliwość bakterii na 23 stresory chemiczne. Wykazano, że szczepy KB7, KB8, KB10, KB12, KC4, KC5 charakteryzowały się dużą zdolnością do wykorzystania różnorodnych źródeł węgla i energii, a także wyższą tolerancją na stresory chemiczne (Fig. 2).

Aktywność symbiotyczną izolatów określono w testach roślinnych, w których kontrolę stanowiły szczepy z gleby uprawianej rolniczo oznaczone 2.9 i 4.15 oraz rośliny niezakażane bakteriami (NC). Aktywne metabolicznie izolaty KC4, KC5 wykazywały najwyższą wydajność symbiotyczną. Świeża masa pędów roślin inokulowanych szczepami KB3, KB7, KB8, KB10, KB11, KB12 również była istotnie wyższa w porównaniu do roślin niezaszczepionych (Fig. 3).

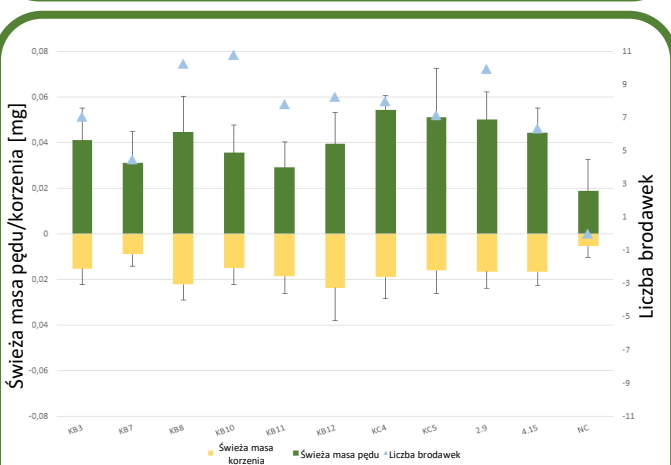


Fig. 3. Właściwości symbiotyczne mikrosymbiontów koniczyny białej i łąkowej wyrażone jako ilość brodawek, masa pędu i korzenia. NC – kontrola negatywna, rośliny niezakażane bakteriami

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę o wysokim potencjale metabolicznym badanych izolatów i ich zdolnościach w promowaniu wzrostu roślin.