

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Vetésforgók hatása az arbuskuláris mikorrhiza gombák (AMF) diverzitására kukorica kultúrákban c. pályázathoz

OTKA-K-101878

Kutatásunk a kukorica monokultúrában végzett, szervesetlen műtrágyázás AM gombák diverzitására gyakorolt hatásának (SASVÁRI és POSTA 2010, SASVÁRI et al. 2011) folytatásaként, annak kibővítésére irányultak, kiterjesztve azt a talaj mikroba-közösségek faji diverzitásának megismerésével.

Növény- és talajmintáink az 1961-ben Győrffy Béla és munkatársai által az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet kísérleti területén, Martonvásáron beállított Vetésforgó vs. monokultúra tartamkísérletből származtak. A tartamkísérletek talaja a szántott rétegben enyhén savanyú, felvehető foszforral gyengén és káliummal jól ellátott humuszos vályog, típusa erdőmaradványos csernozjom. A vetett kukorica Norma SC hibrid, az őszi búza Mv Magvas.

A mintavételt 2012. július 3-án végeztük. Kukorica monokultúrából (CR1), valamint a 3 év lucerna/5 év kukorica (CR3) és a 2 év búza/2 év kukorica (CR5) vetésforgókból a Norma SC hibridkukorica növények gyökereit és rizoszféra-talajait, a Norfolk típusú (CR7) vetésforgóból az Mv Magvas őszi búza növények gyökereit és rizoszféra-talajait gyűjtöttük be, 6 (2x3) ismétlésben. A talajmintákat (3 talajfurat 1 növény körül összerakva = 3 „pooled” talajminta/parcella = 6 „pooled” talajminta/rotációs rendszer = össz. „24 pooled” talajminta) a laborba érkezéskor azonnal 4 °C-ra helyeztük. A gyökérmintákat (3 növényi gyökér/parcella = 6 növény/rotációs rendszer = összesen 24 növényi gyökér) a laborba érkezéskor azonnal mostuk, majd elvégeztük a DNS izolálást, valamint a gyökerek egy részének tinta-ecetsavas festését. A maradék gyökérmintákat -20 °C-on tároltuk.

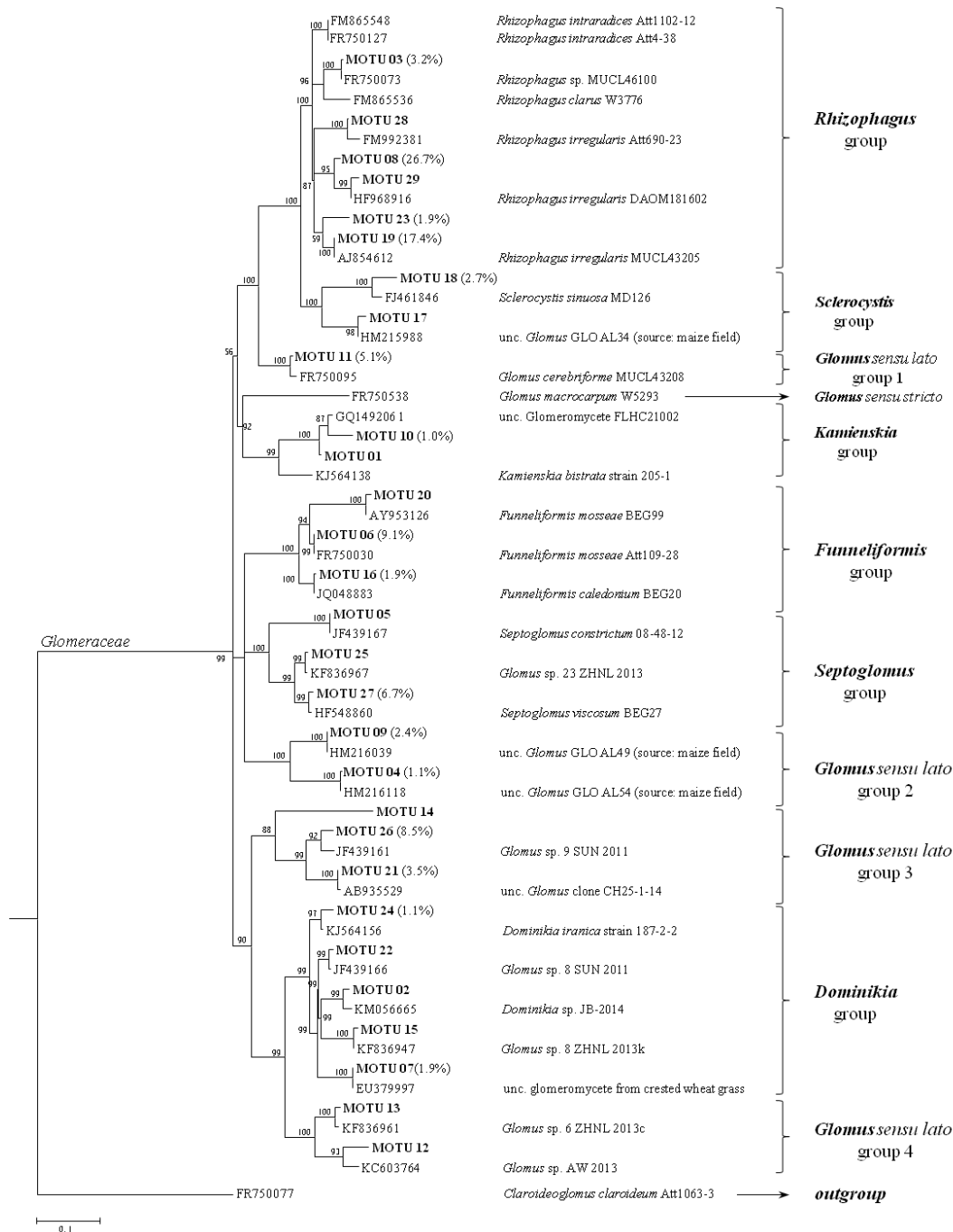
Mikorrhiza populáció(talaj, gyökér) molekuláris jellemzése nested PCR módszerrel

Az AM gombák LSU rDNS-ének részleges felszaporítása két lépésben, ún. nested-PCR-rel történt, melynek első reakciójában az LR1-NDL22 eukarióta specifikus primereket (van TUINEN et al. 1998a,-b), második körében pedig a 28G1-28G2 AM gomba (*Glomeromycota*) specifikus (da SILVA et al. 2006) indítószekvenciákat alkalmaztunk. Összesen $10 \times 96 = 960$ klón (480 talaj-, 480 gyökérmintából származó klón) nukleotid-sorrendjének meghatározását végeztük el (Beckman Coulter Genomics), melyből 815

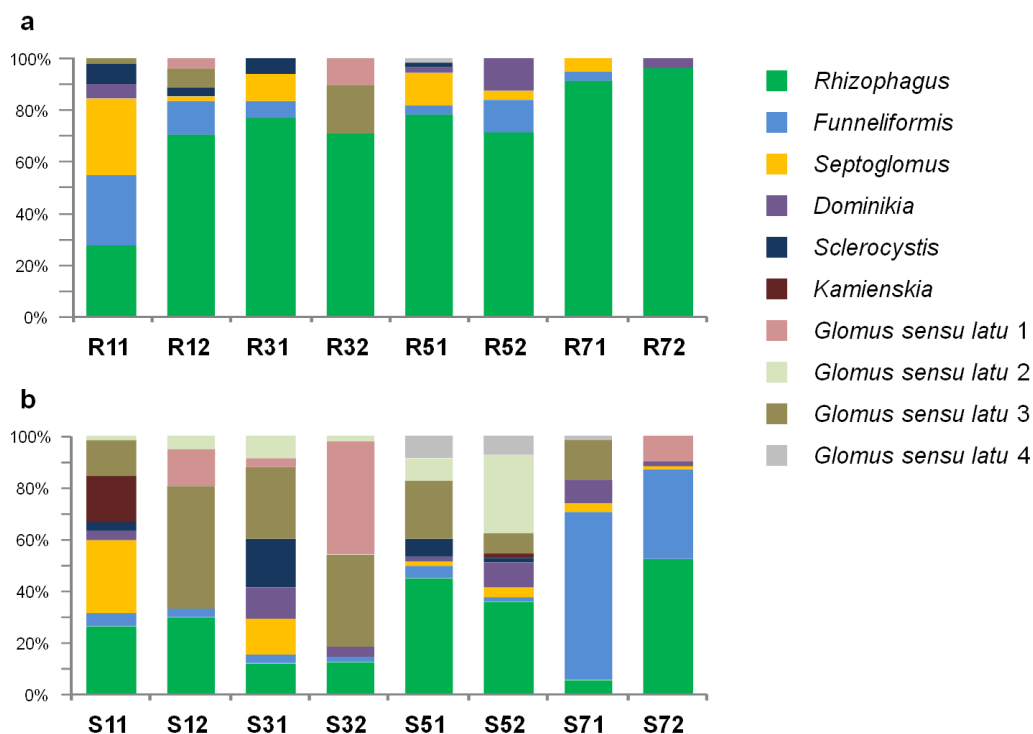
szekvencia bizonyult arbuskuláris mikorrhiza (AM) gomba (Glomeromycota) szekvenciának. Ezek közül 421 szekvencia a gyökérmintákból származott, 394 szekvencia a talajmintákból.

A kutatási projekt harmadik évében elvégeztük a kapott Glomeromycota rDNS szekvenciák összehasonlítását az NCBI nukleotid szekvencia adatbázisában (GenBank) tárolt szekvenciákkal, valamint többszörös szekvencia illesztést és filogenetikai elemzést végeztünk az azonosított gombák taxonómiai kapcsolatainak feltárására. Ennek eredménye a 1. ábrán látható. A 815 Glomeromycota szekvencia elemzése során 29 MOTU-t sikerült elkülönítenünk, melyek mindegyike a Glomeraceae családhoz tartozott. A filogenetikai elemzés alapján a növényi gyökérből meghatározott szekvenciák 73,1%-a, a talajból meghatározott szekvenciák 28%-a a *Rhizophagus* nemzetséghez volt sorolható. A második legrepresentatívabb AM gomba nemzetség a *Funneliformis* nemzetség volt, melybe a gyökér eredetű szekvenciák 8,1%-a, a talaj eredetű szekvenciák 15,2%-a tartozott. Ezt követte csökkenő sorrendbe a *Septoglomus* nemzetség (7,6% gyökérből; 6,7% talajból), a *Dominikia* nemzetség (3% - gyökérből és 5,2% - talajból), a *Sclerocystis* (2,3% és 4%), majd a *Kamienskia* nemzetség (0% és 2,5%). A maradék szekvencia a *sensu lato Glomus* nemzetségéhez (*sensu lato Glomus* 1-4 csoport), a Glomeraceae család bizonytalan rendszertani pozícióval rendelkező nemzetségéhez tartozott.

Meghatároztuk az AM gomba filotípusok %-os eloszlását, külön a talajra, külön a növényi gyökerekre vonatkoztatva (2. ábra). Eredményeink alapján megállapítható, hogy a növényi gyökerek AM gombaközösségének domináns alkotói (kivéve az R11-es mintát) a *Rhizophagus* nemzetség tagjai voltak, melyeknek aránya a kukorica monokultúrától (CR1) a Norfolk típusú rotációig (CR7) növekedett. A két parcella (P1 és P2) átlagát tekintve ez a növekedés az alábbi százalékos arányokkal volt leírható: A kukorica monokultúrában 49%, kukorica-lucerna rotációban 74%, kukorica-búza rotációban 75% és a Norfolk-i négyes rotációban 93,5%. A talajok AM gomba közösségeinek eloszlása egyenletesebb volt, mint a gyökereké. A *sensu lato Glomus* 4-es csoportjának jelenléte a talajok esetében jelentősebb volt, mint a gyökerekben.



1. ábra. A 94.7%-os hasonlósági szinten elkülönített 29 MOTU reprezentáns Glomeromycota LSU rDNS szekvencia alapján, Maximum Likelihood módszerrel készült törzsfa 31 referencia szekvencia bevonásával.



2. ábra. Az azonosított AM gomba filotípusok %-os eloszlása.
Jelölésrendszer: R-gyökér; S-talaj; 1. szám: 1-CR1, 3-CR3, 5-CR5 és 7-CR7 minták;
2. szám: 1-1.Parcella, 2-2. Parcella

A különböző rotációs rendszerek AM-gomba közösségeinek összehasonlításához a biodiverzitási indexeket használtuk, az eredmények statisztikai elemzését is elvégeztük. A nemparaméteres fajszámbecslő görbéket (ACE és Chao1), a ritkasági ún. „rarefaction” görbéket, a Shannon-Wiener diverzitás index (H') értékeket Mothur programmal határoztuk meg 97%-os hasonlósági szinten. A különböző termesztési rendszerek között az átlagos becsült MOTU-k száma alapján érdekes ellentétes sorrendet állítottunk fel a talajok (növekvő AM gomba diverzitás a monokultúrától a Norfolkki négyes rotációig; 9,5-től 15,3-ig) és a gyökerek (csökkenő AM gomba diverzitás a monokultúrától a Norfolkki négyes rotációig; 16,5-ről 6,4-ig) AM gombaközösségeinek diverzitására vonatkozóan. A Shannon-Wiener diverzitás index értékek alapján a CR1>CR5>CR3>CR7 sorrendet állítottuk fel a gyökerek, és CR5>CR1>CR3>CR7 sorrendet a talajok AM gomba közösségeire.

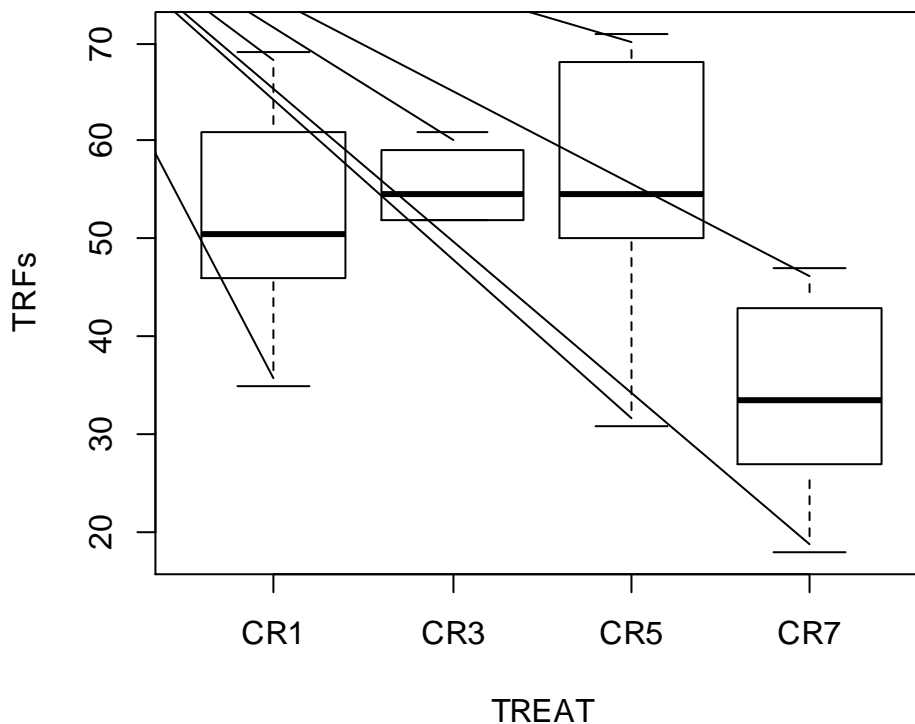
A vizsgálati talajok bakérium-közösségének feltérképezése

A talaj mikroba-közösségek diverzitását terminális hasítási fragmenthossz polimorfizmus (Terminal Fragment Length Polymorphism; T-RFLP) segítségével végeztük.

A különböző rotációs rendszerek talajaiban található baktériumok 16S rDNS génjeinek polimorf fragmentjeit a Phusion Bacterial Profiling Kit fluoreszcensen* jelölt primerei (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' -kék*; és 5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3' -sárga*) segítségével PCR reakció során amplifikáltuk a gyártó utasításai szerint.

Az amplifikált 16S rDNS fragmenteket *MspI* (C'CGC) és *HinP1I* (G'CGC) restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, hogy meghatározzuk a molekuláris ujjlenyomat mintázatukat. A kapilláris futtatást (12 futtatás/rotációs rendszer: 3 talaj DNS/parcella; 2 parcella/rotációs rendszer; 2 ismétlés) az ABI PRISM® Genetic Analyser (Applied Biosystems) 3100-as modellén végeztük GeneScan™ LIZ® 1200 méretmarkerrel. A kromatogramok kiértékelését Peak Scanner™ 1.0 szoftverrel végeztük.

A párhuzamos mintákból származó futások csúcsainak átlagoltása T-Align programban 0,5 konfidencia intervallummal történt. A kapott adatmátrixot standardizáltuk, hogy a csúcsok összterülete egy futáson belül elérje a 100%-ot. Összesen 99 különböző terminális restrikciós fragmentet (T-RF) találtunk. Az átlagos T-RF gazdagság 48,4 volt. A heterogenitás (Béta diverzitás) alacsony volt, 1,04. A CR1 talajminta átlag T-RF száma –„fajgazdagsága”–: 52,00; a CR3: 55,50; a CR5: 54,83 és a CR7 talajmintáké a legalacsonyabb: 33,66. volt (3. ábra).



3. ábra. A különböző rotációs rendszerekből meghatározott baktérium T-RF számai.

Az egyes mintákra diverzitás indexeket számoltunk Ecological Evenness Calculator programmal. A Shannon-Wiener diverzitás index értékek (H' 2,68-2,84) alapján a CR3>CR5>CR7>CR1 sorrendet állítottuk fel a talajok baktérium közösségeire. A T-RFLP ujjlenyomatok egymástól elváló csoportjainak felismerése végett Bray-Curtis hasonlósági index alapján csoportátlag elemzést (UPGMA) végeztünk hierarchikus osztályozás keretében. Az egyes rotációs rendszerek ismétlései mind egy klaszterbe kerültek, a klaszterek között a legkisebb távolság pedig a CR3 és a CR5 rotáció között mutatkozott. A Norfolk-i négyes rotáció (CR7) mutatta a legkisebb hasonlóságot a többi kezeléssel.

A pályázat 4 hónappal történő meghosszabbítására engedélyt kaptunk (EIK-5641/2014.10.10), melyet eredményeink publikálására használtunk fel. Az elfogadásról szóló nyilatkozatot mellékletként csatoltuk. A dologi költségek fennmaradó részét is hosszabbítás alatt használtuk fel, melynek oka, hogy a korábban más forrásból fedezett tartalékot visszaszolgáltattuk.

Irodalomjegyzék

- AUGÉ R.M., TOLER H.D., SAMS C.E., NASIM G. (2008): Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza*, 18 (3): 115-121. p.
- AZCÓN-AGUILAR C., BAREA J.M. (1996): Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6 (6): 457-464. p.
- da SILVA G. A., LUMINI E., MAIA L. C., BONFANTE P., BIANCIOTTO V. (2006): Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183–189.
- FRANK B.F. (1885): Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft*, 3: 128-145. p.
- FÜZY A., BIRÓ B., TÓTH T., HILDEBRANDT J., BOTHE H. (2008): Drought, but not salinity determines the apparent effectiveness of halophytes colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 165 (11): 1181-1192. p.

- GILDON A., TINKER P.B. (1983): Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants: I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, 95 (2): 247-261. p.
- HILDEBRANDT U., REGVAR M., BOTHE H. (2007): Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68 (1): 139-146. p.
- KOVÁCS G.M., BALÁZS T., PÉNZES ZS. (2007): Molecular study of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the eusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, *Ophioglossaceae*). *Mycorrhiza*, 17 (7): 597-605. p.
- KOVÁCS M.G. (2008): Magyarországi növények mikorrhizáltsági vizsgálatainak összefoglalása. Mit mondhatnak ezek az adatok? *Kitaibelia*, 13 (1): 62-73. p.
- LANDWEHR M., HILDEBRANDT U., TÓTH T., BIRÓ B., BOTHE H. (2002): The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza*, 12 (4): 199-211. p.
- LEYVAL C., TURNAU K., HASELWANDTER K. (1997): Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function, physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7 (3): 139-153. p.
- POZO M.J., AZCÓN-AGUILAR C. (2007): Unravelling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 393-398. p.
- SASVÁRI Z., POSTA K. (2010): Effect of different plant densities on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi community in a long-term maize monocrop system. *SJAR*, 8(S1):S123-S130.
- SASVÁRI Z., HORNOK L., POSTA K. (2011): The community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of maize grown in a 50-year monoculture. *Biology and Fertility of Soils*, 47:167–176.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997): Mycorrhizal Symbiosis, 2nd ed. *Academic Press*, London.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. *Academic Press*, London.
- SZÉCSI Á., KÁDÁR I., SZÁNTÓ M. (1989): Endomikorrhiza gombák izolálása kukorica alól csernozjom talajon. *Agrokémia és Talajtan*, 38: 429-438.
- TAKÁCS T., VÖRÖS I. (1998): Colonization of arbuscular endomycorrhizal fungi on maize affected by various N rates in long-term field experiment. *Agrokémia és Talajtan*, 47 (1-4): 289-296.
- TAKÁCS T., BIRÓ B., VÖRÖS I. (2000): Kadmium, nikkell és cink hatása az arbuszkuláris mikorrhiza gombák faji diverzitására. *Agrokémia és Talajtan*, 49 (3-4): 465-476.

- TROUVELOT A., KOUGH J.L. GIANINAZZI-PEARSON V. (1986): Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.). *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, INRA Press, Paris. 217-221. p.
- van TUINEN D., ZHAO B., GIANINAZZI-PEARSON V. (1998a): PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma AK (ed) *Mycorrhiza manual*. Springer, Heidelberg, pp 387–399
- van TUINEN D., JACQUOT E. ZHAO B., GOLLOTTE A., GIANINAZZI-PEARSON V. (1998b): Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7:879–887
- VIERHEILIG H., COUGHLAN A.P., WYSS U., PICHE Y. (1998): Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 5004-5007.

Applied Ecology and Environmental Research

International Scientific Journal

ISSN 1589-1623 (Print), ISSN 1785-0037 (Online)

Editorial Board of AEER
ALÖKI Applied Ecological Research and Forensic Institute
Ltd.

H-1185, Budapest, Kassa u. 118

aeerjournal@gmail.com
<http://www.aloki.hu>

Subject: Certificate of Acceptance

Paper reference number: AEER 3007

Title of Paper: Assessment of native arbuscular mycorrhizal fungi assemblages under different regimes of crop rotation

Author(s): Magurno, F., Sasvári, Z., Posta, K.

Dear Authors,

The Editorial Board of Applied Ecology and Environmental Research hereby states with great pleasure that following the reviewing process, your above indicated manuscript has been accepted for publication in AEER; its current status is "in press".

Currently the technical editing work is in progress, therefore we ask for your patience and we also would like to thank you for your submitted paper.

With best regards:



Levente Hufnagel
Editor-in-Chief of AEER

www.aloki.hu

Budapest, 2015-06-24