

Wpływ inokulum bakterii pożytecznych na zdolności funkcjonalne zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających fyllosferę i ryzosferę malin

The effect of beneficial bacteria inoculum on the functional abilities of microbial communities inhabiting raspberry phyllosphere and rhizosphere

Michał Pylak, Karolina Oszust, Jacek Panek, Magdalena Frąc
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk
m.pylak@ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

Wprowadzenie

Materiały i metody

- Odpowiednio dobrane i zastosowane konsorcja bakteryjne mogą nie tylko pomóc w **ograniczeniu skutków infekcji grzybowych**, ale także wzmocnić **odporność systemiczną** roślin, **zwiększyć plon**, ale również ilość mikro i makroskładników obecnych w glebie i dostępnych dla roślin.
- **Naturalizacja** to proces polegający na stosowaniu pożytecznych mikroorganizmów wyizolowanych z dzikorosnących zdrowych roślin na rośliny uprawne w celu walki z patogenami, stymulacji wzrostu oraz zwiększania aktywności mikrobiologicznej gleby.
- Badanie zmian mikrobioty glebowej pozwala na **określenie interakcji pomiędzy wprowadzanymi do nowej niszy mikroorganizmami, a tymi, które są już w niej obecne**.
- Zastosowane mikroorganizmy wykazały zdolność do **hamowania wzrostu badanych fitopatogenów**. Celem tego eksperymentu było określenie wpływu inokulum bakterii użytych do naturalizacji ryzosfery malin na społeczność bakterii glebowych w doświadczeniu wazonowym.

- Bakterie użyte do naturalizacji to **4 szczepy** naturalnie występujące w ryzosferze malin dzikorosnących, należące do rodzajów *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, wykazujące **działanie hamujące wzrost wybranych fitopatogenów**.
- Kultury mikroorganizmów aplikowano na korzenie **podczas sadzenia (R)**, poprzez **podlewanie (W)** oraz w **sposób łączony (RW)**.
- Zastosowano również **zakażenie 4 fitopatogenami** należącymi do rodzajów *Botrytis cinerea* (B), *Colletotrichum acutatum* (C), *Phytophthora* (P) oraz *Verticillium* (V) oraz wariant bez zakażenia (W).
- Po zakończonym doświadczeniu z próbek gleby ryzosferowej wyizolowano DNA oraz z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS) wykonano analizę **różnorodności mikroorganizmów glebowych**.
- Na podstawie próbek gleby przeprowadzono również analizę **uzdolnień metabolicznych** mikroorganizmów glebowych z wykorzystaniem płytek **EcoPlates** systemu BIOLOG® oraz wyliczono **wskaźnik stresu substratowego (SST)** będący stosunkiem wartości absorbancji uzyskanych dla długości fali **590 nm i 750 nm**.



Ryzosfera jest źródłem mikroorganizmów pożytecznych



Izolaty środowiskowe bakterii mają zdolność hamowania wzrostu fitopatogenów



Aplikacja inokulum bakterii pożytecznych wpływa nie tylko na fitopatogeny grzybowe, ale również na zbiorowiska mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę i fyllosferę



Doświadczenie fitotronowe:

- sadzonki malin
- 21°C
- 16h dnia, 8h nocy
- 8 tygodni

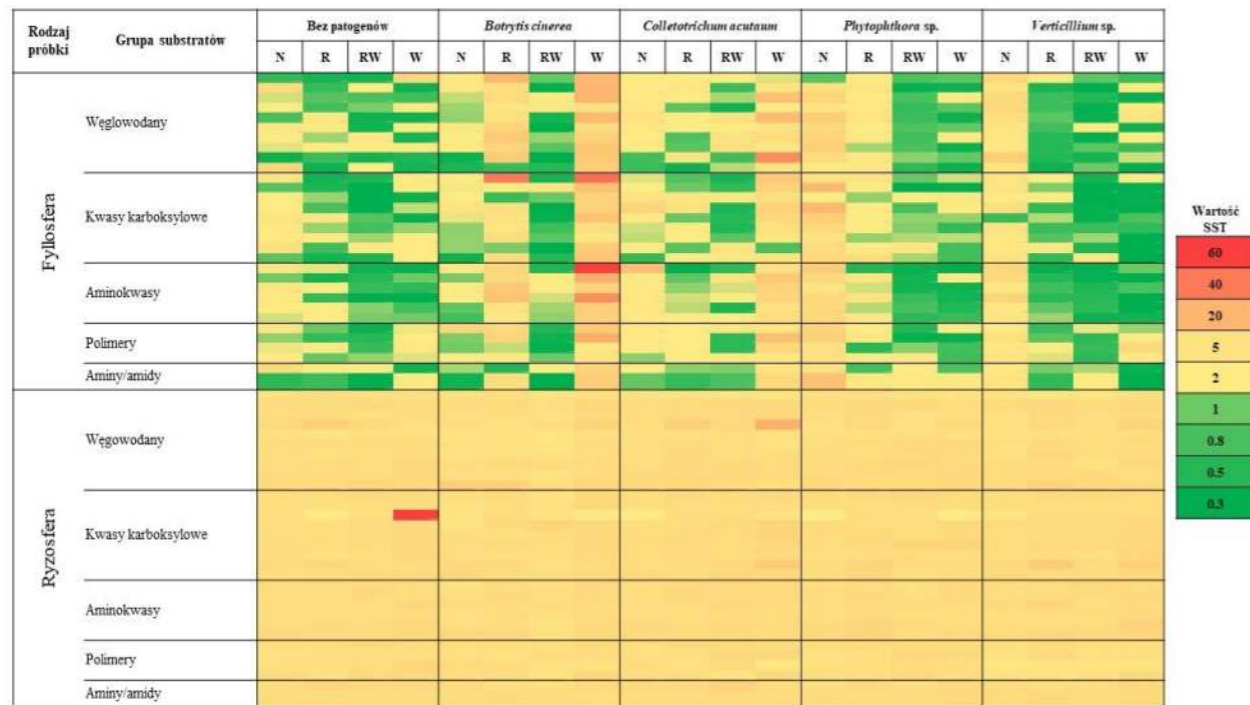


- Aplikacja inokulum bakteryjnego podczas sadzenia, podczas podlewania lub na oba sposoby
- Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp.



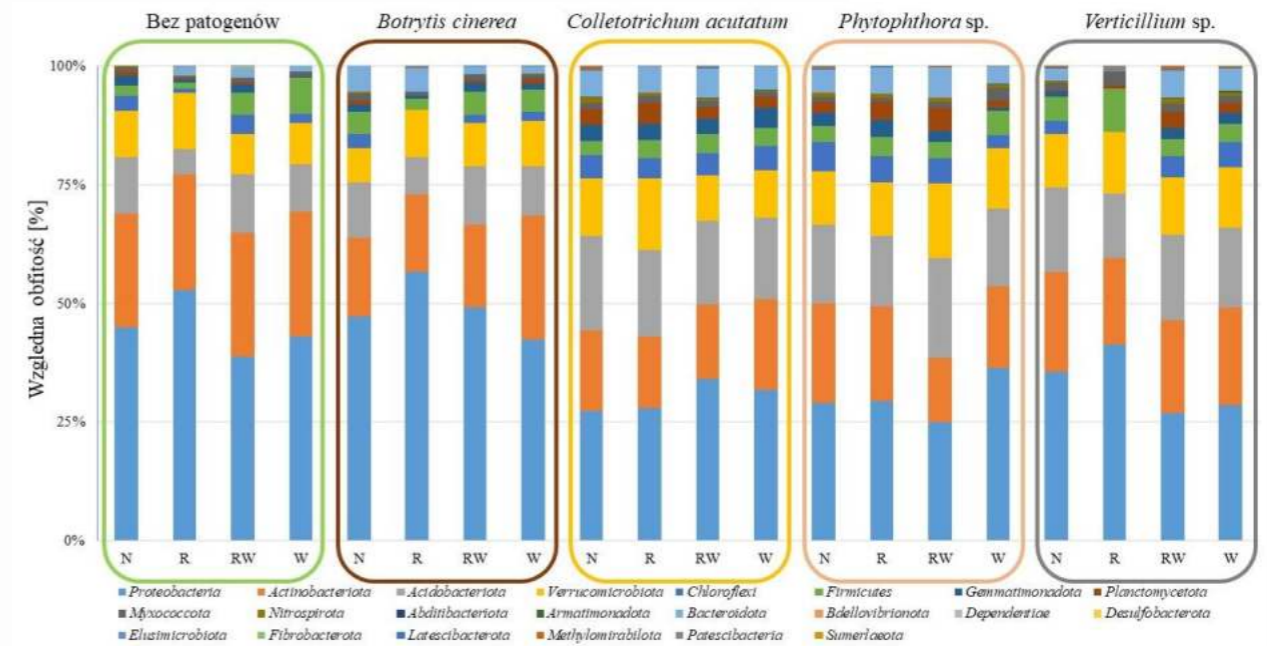
- Aplikacja inokulum fitopatogenów podczas sadzenia na korzenie oraz 4 tygodnie po sadzeniu na liście i pędy



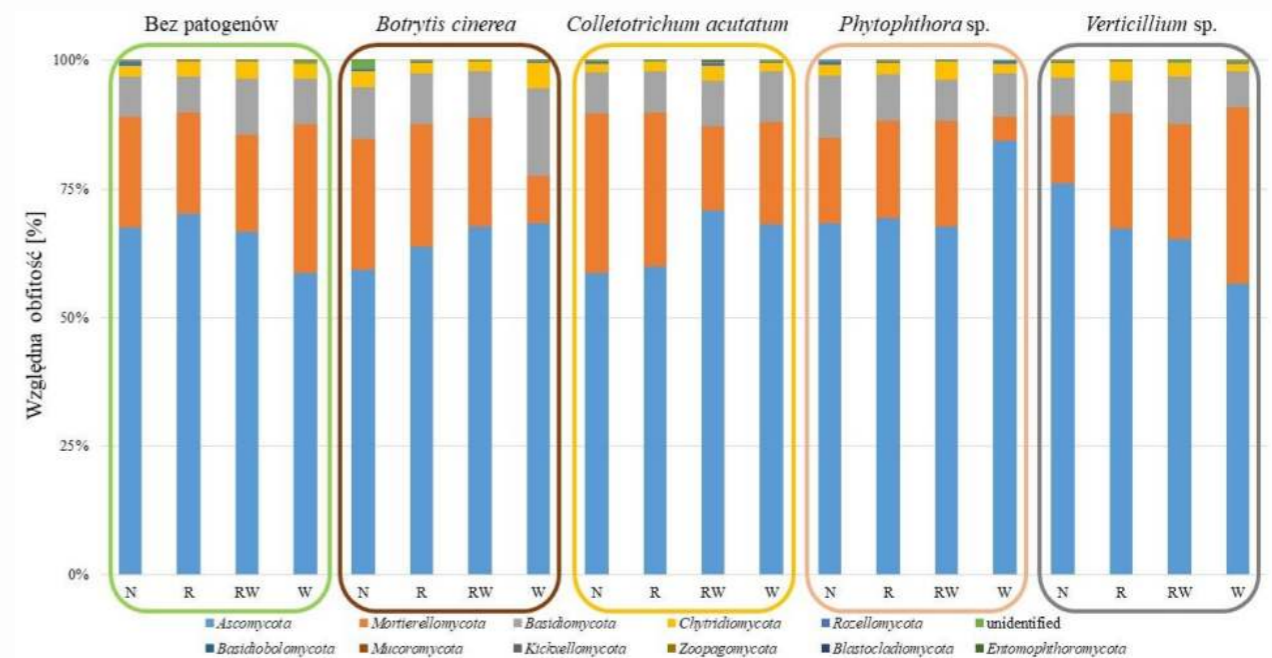


Rys. 2. Wartości SST obliczone na podstawie wartości absorbancji zmierzonych dla długości fali 590 nm i 750 nm dla różnych źródeł węgla, zarówno dla próbek gleby ryzosferowej jak i fylosfery malin. N – bez naturalizacji, R – naturalizacja korzeni podczas sadzenia, W – podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu, RW – naturalizacja łączona obejmująca naturalizację korzeni podczas sadzenia i podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu.

- Na wartość wskaźnika stresu substratowego dla zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę nie miała wpływu zarówno obecność patogenu, jak i zastosowana strategia naturalizacji. Jednak **duże zróżnicowanie można zaobserwować w wartościach SST obliczonych dla próbek fylosfery**. W obiektach niezawierających patogenów dodanie inokulum bakteryjnego skutkowało **obniżeniem SST bez względu na zastosowaną strategię naturalizacji**.
- W próbkach gleby zidentyfikowano **22 typy bakterii**, spośród których najbardziej powszechne były **Proteobacteria (27-55%)** i **Actinobacteriota (16-22%)**. Trzeci i czwarty pod względem obfitości typ stanowiły odpowiednio **Acidobacteriota (8-21%)** i **Verrucomicbiota (9-15%)**.
- Pomimo tego, że w próbkach ryzosfery malin zidentyfikowano **11 typów grzybów**, 3 z nich odpowiadają za ponad 95% obfitości względnej. **Ascomycota (55-85%)**, **Mortierellomycota (4-32%)** i **Basidiomycota (6-20%)**.

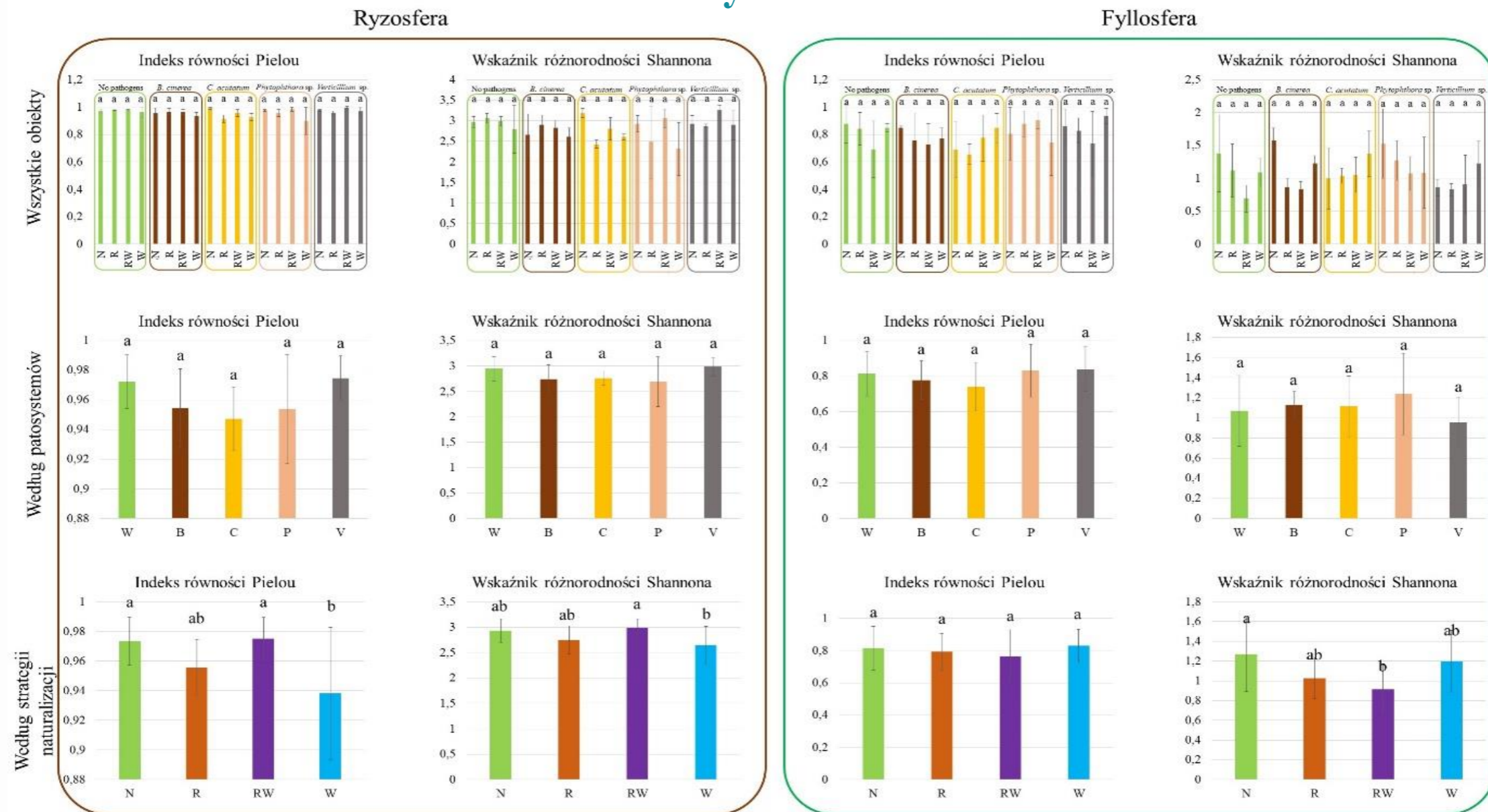


Rys. 3. Skład taksonomiczny zbiorowisk bakterii glebowych zasiedlających ryzosferę malin w doświadczeniu wazonowym. N – bez naturalizacji, R – naturalizacja korzeni podczas sadzenia, W – podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu, RW – naturalizacja łączona obejmująca naturalizację korzeni podczas sadzenia i podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu.



Rys. 4. Skład taksonomiczny zbiorowisk grzybów zasiedlających ryzosferę malin w doświadczeniu wazonowym. N – bez naturalizacji, R – naturalizacja korzeni podczas sadzenia, W – podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu, RW – naturalizacja łączona obejmująca naturalizację korzeni podczas sadzenia i podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu.

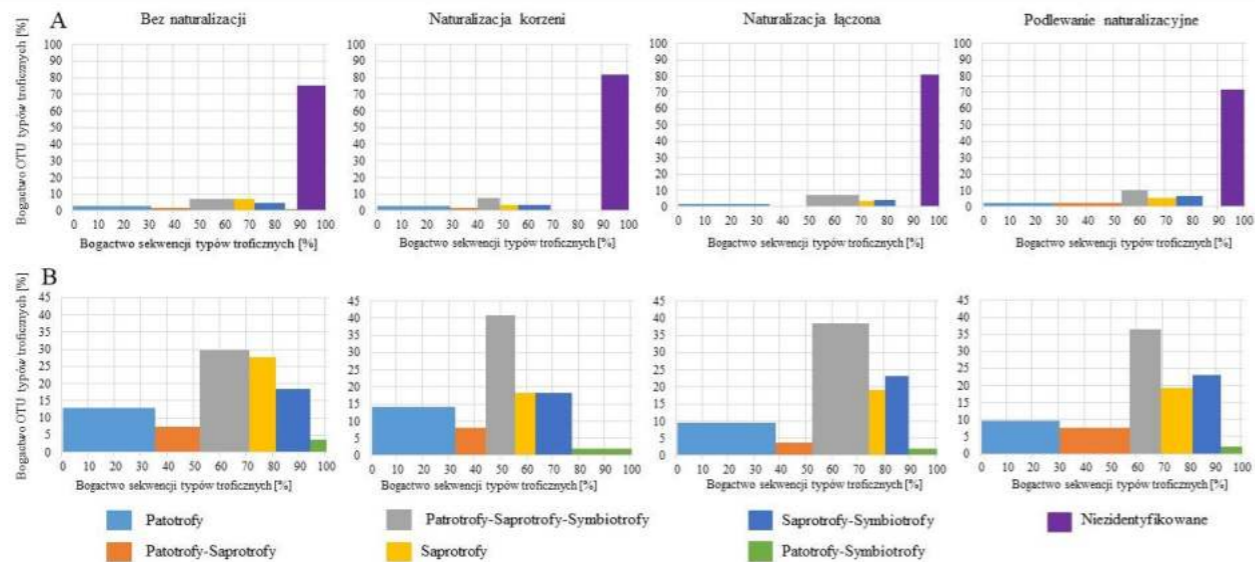
Wyniki



Rys. 5. Wartości wskaźników bioróżnorodności dla zbiorowisk grzybowych zasiedlających ryzosferę malin. B – *Botrytis cinerea*, V – *Verticillium* sp., C – *Colletotrichum acutatum*, P – *Phytophthora* sp., N – bez naturalizacji, R – naturalizacja korzeni podczas sadzenia, W – podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu, RW – naturalizacja łączona obejmująca naturalizację korzeni podczas sadzenia i podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu.

- Bioróżnorodność zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających fyllosferę malin podlegała zmianom wywołanym zarówno przez **obecność patogenów** (choć te zmiany nie były istotne statystycznie) jak i **zastosowane strategie naturalizacji**.
- Szczególną uwagę warto zwrócić na **obniżenie wartości wskaźnika różnorodności Shannona**, którego wartość była istotnie niższa pod wpływem każdego z badanych sposobów naturalizacji, a najniższa była dla naturalizacji łączonej.
- **Zbiorowiska grzybów zasiedlające fyllosferę** charakteryzowały się **niższymi wartościami równości Pielou**, oraz **wyższą zmiennością** wartości wskaźnika różnorodności Shannona spowodowanymi większym narażeniem na warunki środowiskowe.
- Statystycznie istotne obniżenie wskaźnika różnorodności Shannona dla zbiorowisk grzybowych zasiedlających fyllosferę może być spowodowana **przeciwgrzybiczymi właściwościami zastosowanego inokulum pożytecznych bakterii**.

Wyniki



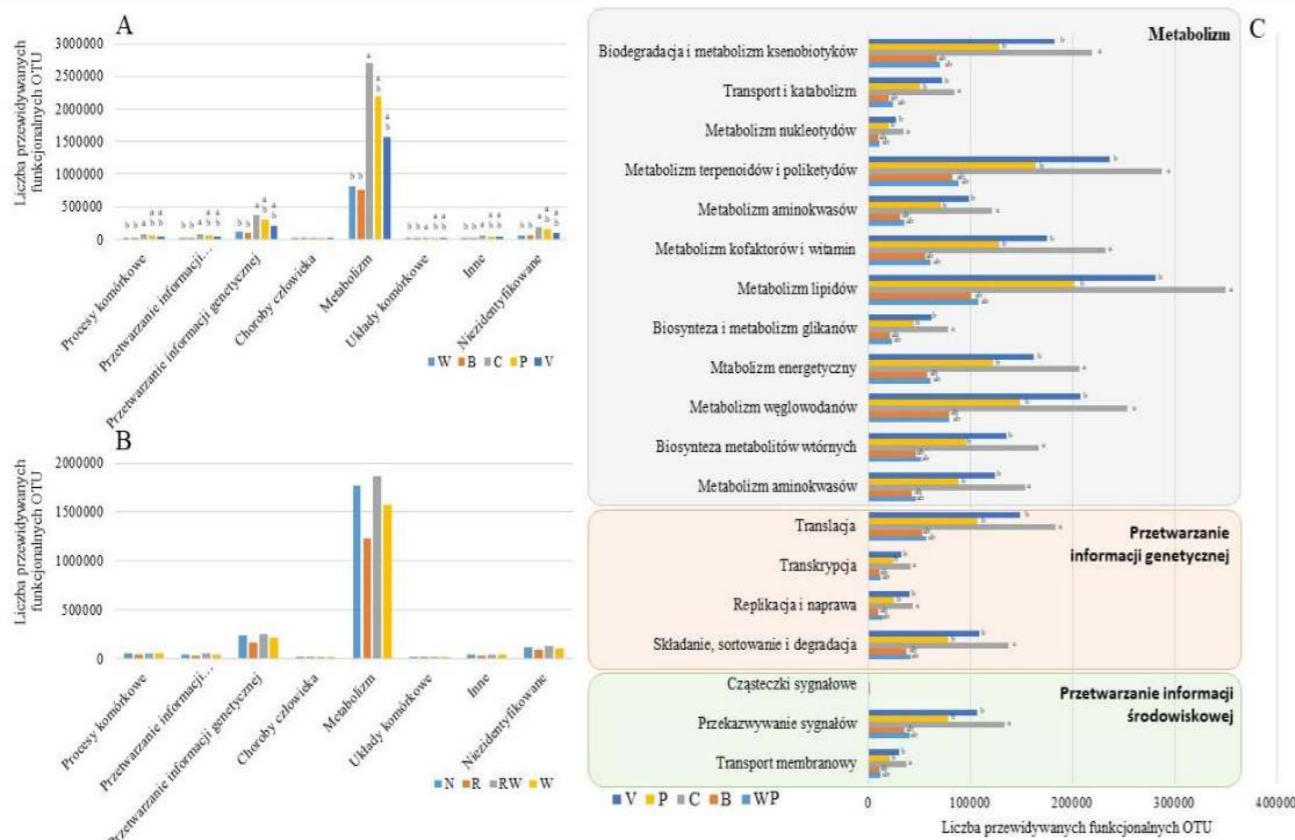
Rys. 8. Względne bogactwo OTU i sekwencji dla grzybów zidentyfikowanych w ryzosferze pogrupowana ze względu na zastosowaną strategię naturalizacji. Część A przedstawia wyniki z uwzględnieniem niezidentyfikowanych grzybów, część B przedstawia wyniki z wyłączeniem grzybów niezidentyfikowanych. Wysokość kolumny reprezentuje obfitość OTU, a szerokość kolumny reprezentuje obfitość sekwencji.

- **Typy troficzne** mikroorganizmów grzybowych obecnych w próbkach ryzosfery zidentyfikowano za pomocą narzędzia **FUNGuild**. Zidentyfikowane i niezidentyfikowane mikroorganizmy podzielono zgodnie ze strategią naturalizacji, patosystemami i ich typami troficznymi na **patotrofy, saprotrofy, symbiotrofy** i ich kombinacje.
- We wszystkich próbkach przeważały **mikroorganizmy niezidentyfikowane**, a ich względne bogactwo OTU stanowiło **70-80%** wszystkich obecnych OTU. Jednak ich bogactwo sekwencji wynoszące od 7% do 10% było porównywalne z innymi mikroorganizmami, oprócz patotrofów.
- **Zmniejszenie się bogactwa OTU organizmów patotroficznych** było obserwowane w obiektach, w których zastosowano naturalizację łączoną lub podlewanie naturalizacyjne.

- Zidentyfikowane OTU bakteryjne poddane zostały analizie z wykorzystaniem środowiska **PICRUSt** i bazy **KEGG**, która pozwoliła na podział OTU na odpowiedzialne za odpowiednie grupy procesów metabolicznych.
- Obecność patogenów za wyjątkiem *B. cinerea* powodowała **zwiększenie ilości przewidywanych funkcjonalnych OTU**, a najwyższe wzbudzenie metabolizmu zbiorowisk widoczne było dla obiektów zakażonych *C. acutatum*.
- **Najsilniej reprezentowanymi podklasami** w metabolizmie zbiorowisk bakteryjnych były **metabolizm lipidów, węglowodanów, terpenoidów, poliketydów, ksenobiotyków**, a także **metabolizm kofaktorów i witamin**.

Wnioski

- Zbiorowiska mikroorganizmów **zasiedlających ryzosferę malin** są **bardziej odporne na zmiany** różnorodności funkcjonalnej niż zbiorowiska zasiedlające fyllosferę.
- Aplikacja inokulum pożytecznych szczepów bakterii spowodowała **zmniejszenie wskaźnika różnorodności Shannona** dla zbiorowisk mikroorganizmów grzybowych zasiedlających ryzosferę malin.
- Aplikacja inokulum pożytecznych szczepów bakterii spowodowała **statystycznie istotne zmiany w metabolizmie zbiorowisk mikroorganizmów glebowych**, zwiększając liczbę operacyjnych jednostek taksonomicznych związanych z metabolizmem bakterii i procesami komórkowymi.



Rysunek 11. Przewidywany profil funkcjonalny zbiorowisk bakterii na podstawie zidentyfikowanych OTU, pod względem patosystemów (A i C) oraz naturalizacji (B). B – *Botrytis cinerea*, V – *Verticillium* sp., C – *Colletotrichum acutatum*, P – *Phytophthora* sp., N – bez naturalizacji, R – naturalizacja korzeni podczas sadzenia, W – podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu, RW – naturalizacja łączona obejmująca naturalizację korzeni podczas sadzenia i podlewanie naturalizacyjne 4 tygodnie po posadzeniu.