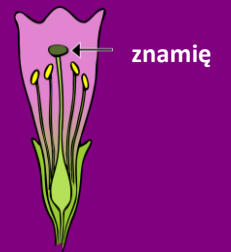


RÓŻNORODNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW W ZNAMIONACH SŁUPKA

W KWIATACH ZAGROŻONEGO HOLOPASOŻYTA

PHELIPANCHE ARENARIA (OROBANCHACEAE)KAROLINA WIŚNIEWSKA^{1*}, SEBASTIAN WOJCIECH PRZEMIENIECKI², MAGDALENA BŁASZAK³,SYLWIA DAGMARA CZARNOMSKA⁴, IRENEUSZ OCHMIAN⁵, RENATA PIWOWARCZYK¹¹Centrum Badań i Ochrony Różnorodności Biologicznej, Zakład Biologii Środowiska, Instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce, *e-mail: karolina.ruraz@ujk.edu.pl,²Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn,³Katedra Bioinżynierii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin,⁴Muzeum i Instytut Zoologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Nadwiślańska 108, 80-680 Gdańsk,⁵Katedra Ogrodnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin

WPROWADZENIE

Znamię będące częścią słupka i połączone z zalaznią pełni istotną rolę w procesie reprodukcji roślin, jest wyspecjalizowaną tkanką o efemerycznej strukturze. Spośród wielu różnych organów kwiatowych, znamiona wykazujące różnorodność kolorystyczną i morfologiczną, są atrakcyjne dla zapylaczy i przyczyniają się do powodzenia zapylania. Znamiona są bogate w składniki odżywcze, zawierają białka, lipidy, polisacharydy i inne składniki, dlatego są ważnym źródłem składników odżywczych dla mikroorganizmów. Może to wpływać na proces zapylenia poprzez produkcję specyficznych metabolitów oraz oddziaływać na zachowanie zapylaczy poprzez modyfikacje zapachu kwiatów lub nawet izolację rozrodczą.

Phelipanche arenaria (Borkh.) Pomel jest rośliną holopasożytniczą należącą do rodziny Orobanchaceae. Pasożytuje głównie na gatunkach z rodzaju bylica, głównie na bylicy polnej (*Artemisia campestris* L.). Orobanchaceae to największa pasożytnicza rodzina, obejmująca 102 rodzaje i ponad 2100 gatunków. Głównymi ośrodkami ich różnorodności biologicznej i pochodzenia są Basen Morza Śródziemnego i Azja Zachodnia (Kaukaz). To pasożyty korzeniowe roślin uprawnych i roślin dziko występujących, które są pozbawione chlorofilu. Większość gatunków to jednak gatunki rzadkie i zagrożone wyginięciem. Wytwarzają imponujące barwne kwiatostany, a ich strategia życiowa jest silnie ukierunkowana na maksymalizację sukcesu reprodukcyjnego poprzez zapylenie i wyprodukowanie jak największej liczby nasion.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano niedojrzałe i dojrzałe znamiona słupka gatunku rośliny pasożytniczej *Phelipanche arenaria* (Orobanchaceae) zebrane w Zwierzyńcu (województwo świętokrzyskie) (Fot. 1). Analizy laboratoryjne polegały na wypreparowaniu znamion słupka z kwiatów w odpowiednio sterylnych warunkach, słupek został odcięty jak najbliższej podstawy znamienia. Zastosowano techniki hodowlane i sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) oraz zbadano aktywność enzymatyczną zbiorowisk bakteryjnych. Do analizy NGS wykorzystano 4 próbki, każda próbka zawierała około 1 gram znamion. Kolejne analizy laboratoryjne przeprowadziła firma A&A Biotechnology (Polska), natomiast przygotowanie biblioteki NGS oraz sekwencjonowanie (16S rRNA i ITS) przeprowadziła firma Macrogen (Holandia).

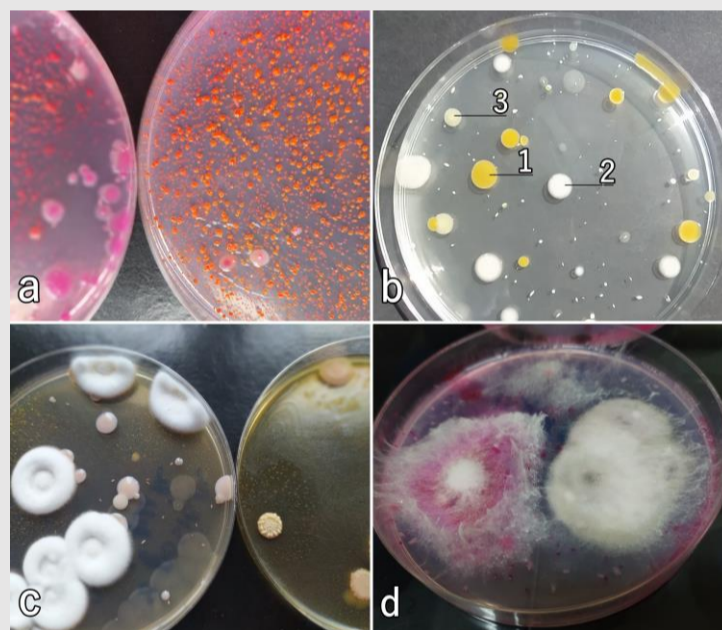
WYNIKI

Wykorzystując technikę sekwencjonowania nowej generacji (NGS), zidentyfikowaliśmy i sklasyfikowaliśmy ponad **70 OTU bakteryjnych** reprezentowanych głównie przez *Pantoea* (50,8%), a następnie *Pseudomonas* spp. (9,9%) i *Luteibacter* spp. (6%). W znamionach niedojrzałych dominuje *P. agglomerans*, w znamionach dojrzałych *P. ananatis*. Profil bakteryjny niedojrzałych znamion *Phelipanche arenaria* zawierał **unikalne mikroorganizmy** (21 z najliczniejszych OTU), których **nie potwierdzono w przypadku dojrzałych znamion** (Ryc. 1a).

W mikrobiomie grzybowym zanotowaliśmy ponad **70 OTU w dojrzałych znamionach**, w tym głównie Capnodiales (45,0%), następnie *Alternaria* spp. (12,8%), *Mycosphaerella* sp. (9,7%) i *Aureobasidium* sp. (8,0%). Znamiona *P. arenaria* zostały skolonizowane przez mikroorganizmy o szerokim spektrum działania, od tych potencjalnie pożytecznych po patogenne dla roślin. Zidentyfikowano wiele bakterii związanych z **ryzosferą**, natomiast wśród grzybów powszechnie notowane były **drożdże** mogące wykazywać zdolność do biokontroli (Ryc. 1a).

Aktywność enzymatyczna bakterii w **dojrzałych znamionach** *P. arenaria* (PA1) była silniej obserwowana niż w przypadku niedojrzałych znamion (PA2-4) (Ryc. 1b, 2).

Wyselekcjonowano i zidentyfikowano za pomocą sekwencjonowania Sangera 9 izolatów bakterii w niedojrzałych znamionach: *Bacillus megaterium*, *Microbacterium testaceum*, *P. agglomerans*, *Rahnella victoriana*, *R. variigena*, *Rhodococcus corynebacterioides*. Natomiast w dojrzałych znamionach zidentyfikowano 8 izolatów bakteryjnych i 3 grzybowe: *P. agglomerans*, *Pseudomonas cedrina*, *P. gessardii*, *P. lurida*, *Sphingomonas aquatilis*, *Stenomorphomonas maltophilia*, *Beauveria bassiana*, *Fusarium avenaceum* oraz *Cladosporium subuliforme* (Fot. 2).



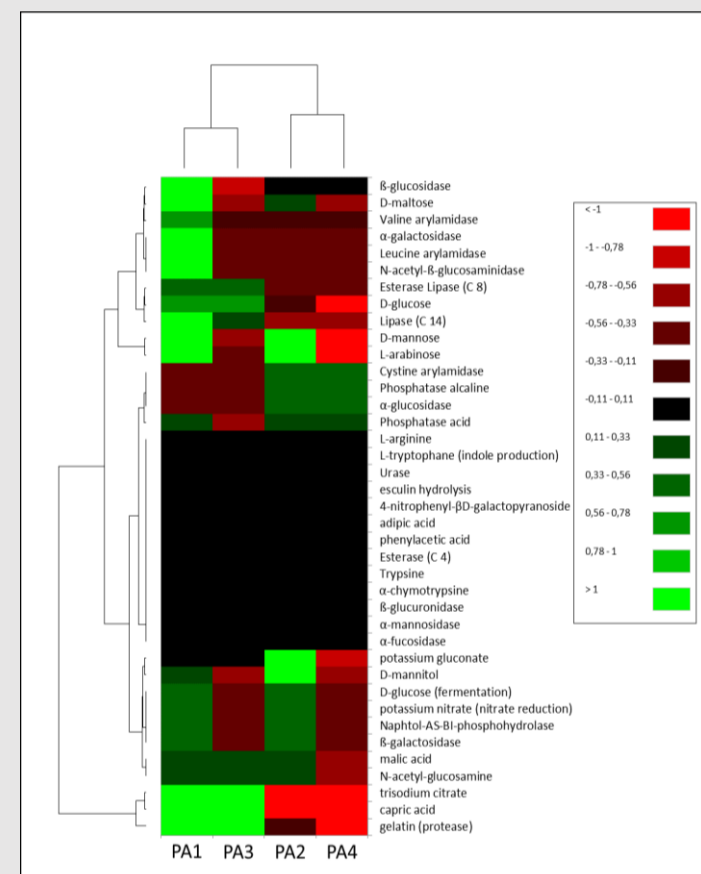
Fot. 2. Wybrane kolonie bakterii i grzybów zdolnych do hodowli. (a) pomarańczowe kolonie *Sphingomonas aquatilis* (podłoże Rose Bengal Agar), (b) izolaty bakteryjne wyhodowane na podłożu Trypticase Soy Agar: 1. *Pantoea agglomerans*, 2. *Pseudomonas lurida*, 3. *Stenomorphomonas maltophilia*, (c) *Beauveria bassiana* wyhodowany na podłożu Yeast Extract-Peptone-Glycerol Agar, obok *Stenomorphomonas maltophilia*, (d) *Fusarium avenaceum* (po lewej) i *Cladosporium* sp. (po prawej) na podłożu Rose Bengal Agar.

CEL BADAŃ

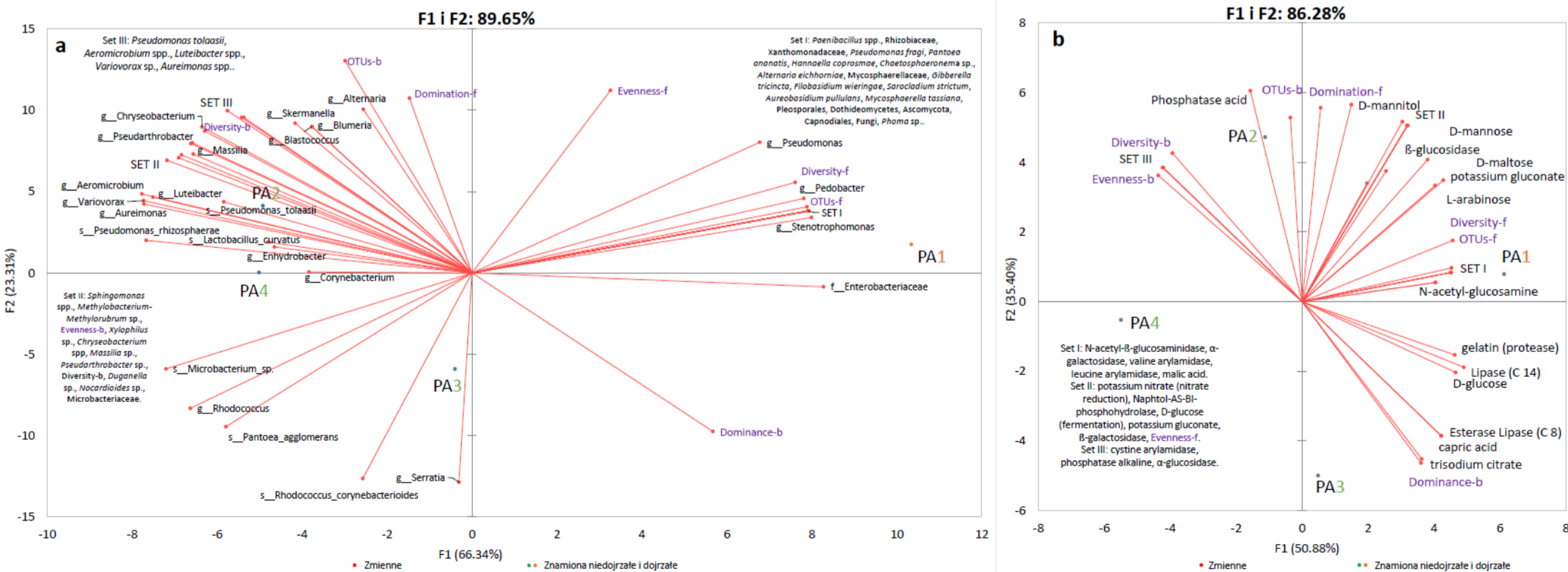
Celem badań była analiza różnorodności zbiorowisk bakteryjnych i grzybowych zasiedlających znamiona słupka *Phelipanche arenaria* przy użyciu metod molekularnych (NGS) i technik hodowlanych. Pobrano niedojrzałe znamiona z zamkniętych pąków kwiatowych i dojrzałe znamiona z otwartych kwiatów, aby zbadać, jak zbiorowiska mikroorganizmów zmieniają się podczas rozwoju kwiatów i oddziaływania ze strony środowiska zewnętrznego. Porównano także aktywność enzymatyczną zbiorowisk bakteryjnych w próbkach niedojrzałych i dojrzałych znamion.



Fot. 1. *Phelipanche arenaria* (A) pokrój ogólny, (B, C) otwarte kwiaty z białawym znamieniem słupka (fot. R. Piwowarczyk); Dwupłatowe znamiona słupka *Phelipanche arenaria* z licznymi brodawkami (D, E, F, G) (widok z boku (D), widok od góry (E), widok z przodu (F, G)) (D, F, G 1mm; e 0.5 mm. fot. K. Zubek)



Ryc. 2. Potencjalna aktywność biochemiczna zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających niedojrzałe i dojrzałe znamiona *Phelipanche arenaria*. Wzrost względnej zawartości potencjalnej aktywności biochemicznej jest reprezentowany przez przejście od koloru zielonego przez czarny do czerwonego, jak pokazano na rycinie.



Ryc. 1. Analiza PCA obrazująca zależności między bakteriami i grzybami (a) oraz potencjałem biochemicznym mikroorganizmów (b) zasiedlających niedojrzałe (2,3,4) i dojrzałe (1) znamiona słupka *Phelipanche arenaria* (PA)

PODSUMOWANIE

Znamiona *Phelipanche arenaria* są mikrosiedliskiem różnorodnych zbiorowisk bakterii i grzybów. Zidentyfikowane mikroorganizmy mogą potencjalnie odgrywać istotną rolę w promowaniu lub hamowaniu wielu procesów związanych ze wzrostem, reprodukcją i zdrowiem roślin. Mogą one również wpływać na populacje owadów zapylających (np. bakterie odpowiadające za degradację chityny, patogeny grzybowe owadów). Niektóre z tych mikroorganizmów mogą nawet zastępować pyłek zarodnikami grzybów, co prowadzi do sterylizacji roślin. Mikroorganizmy zasiedlające znamiona są dobrze znane jako korzystne w zastosowaniach biotechnologicznych i środowiskowych (np. w produkcji różnych enzymów i związków przeciwdrobnoustrojowych). Przeprowadzone badania obrazują różnorodność, złożoność i znaczenie świata mikroorganizmów w organie kwiatowym o kluczowym znaczeniu dla reprodukcji roślin, jakim jest znamię słupka, pomimo że ma on zaledwie kilka milimetrów wielkości i efemeryczną strukturę.