

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.: Identyfikacja zespołów bakterii związanych z naturalnymi stanowiskami trufli *Tuber* spp.

mgr Marta Siebyła, Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

Streszczenie

Strefa korzeni roślin jest warstwą gleby najliczniej zasiedlaną przez mikroorganizmy, takie jak bakterie i grzyby, a wśród nich tworzące mykoryzy, bezpośrednio współdziałające z systemem korzeniowym roślin. Szacuje się, że liczebność bakterii w warstwie ryzosferowej jest stukrotnie większa, w porównaniu do miejsc poza tą warstwą. W drzewostanach, wśród wielu gatunków grzybów, występują także należące do workowców ektomykoryzowe grzyby podziemne z rodzaju trufła – *Tuber* spp.

Rozprawa doktorska jest podsumowaniem cyklu 5 prac mających na celu poznanie roli zbiorowisk bakterii w tak zwanym ‘środowisku truflowym’, uwzględniającym glebę, korzenie drobne drzew i krzewów z mykoryzami oraz stwierdzone tam owocniki trufli letniej (*Tuber aestivum*). Badania prowadzono w trzech wybranych lokalizacjach oznaczonych dalej, jako G, M i W w makroregionie Niecki Nidziańskiej. Powierzchnie badawcze znajdowały się we wcześniej zlokalizowanych wydzieleniach występowania owocników trufli letniej (Hilszczańska i in., 2014, 2016, 2019), oznaczonych w rozprawie, jako T (stanowisko z truflą) oraz w wydzieleniach, w których nie stwierdzono obecności trufli, oznaczonych jako K (kontrola). Powierzchnie ze stwierdzoną obecnością owocników trufli, jakkolwiek zlokalizowane w obrębie tego samego mezoregionu, różniły się jednak pod względem cech drzewostanu, podłoża, odczynu oraz składu chemicznego gleby, co umożliwiło poznanie szerszego spektrum zespołów bakterii charakteryzujących „stanowiska trufłowe”.

Zbadano skład chemiczny gleby, przeprowadzono analizy ilościowe (metodą klasyczną) i jakościowe (metodą molekularną z wykorzystaniem metody Sangera) (Publikacja 1), określono ilościowe stężenie DNA w reakcji - liczby docelowych fragmentów genu 16S rRNA w próbkach z gleby z wykorzystaniem metody qPCR i wykonano analizy biochemiczne dotyczące oceny bioróżnorodności funkcjonalnej bakterii glebowych wykorzystując metodę BIOLOG (Publikacja 3). Zastosowano zarówno klasyczną metodę hodowlaną z wykorzystaniem analiz jakościowych – sekwencjonowanie DNA metodą Sangera, jak i metodę NGS. Skład gatunkowy bakterii oraz liczbę zidentyfikowanych sekwencji OTU określono w rozprawie na podstawie analizy gleby, korzeni i owocników (perydiów i gleby) (Publikacje 2, 4, 5).

Zarówno wyniki dotyczące składu chemicznego gleb, analizy klasyczne, biochemiczne, jak i molekularne zbiorowisk bakterii wykazały różnice ilościowe i jakościowe pomiędzy próbkami

gleb i korzeni w miejscach występowania owocników trufli letniej oraz na stanowiskach kontrolnych, a także odmienność względem zbiorowisk zasiedlających owocniki. Stwierdzono wpływ warunków wzrostu drzew (siedlisko, skład gatunkowy), jak i przebiegu pogody i pory roku na zróżnicowanie lub podobieństwo mikrobiomów.

Analiza metagenomiczna próbek DNA wyizolowanego bezpośrednio z gleby pozwoliła na wyróżnienie sześciu dominujących klas bakterii: *Proteobacteria* (30% - 65%), *Actinobacteria* (7% - 36%), *Bacteroidetes* (1% - 30%), *Acidobacteria* (0,3% - 30%), *Planctomycetes* (0,2% - 10%), *Chloroflexi* (2% - 23%). Bakterie z klas: *Chloroflexi* i *Actinobacteria* liczniej występowały w wariancie, w którym odnotowano obecność trufli letniej (~60%), zaś *Proteobacteria* i *Firmicutes* dominowały w wariancie kontrolnym (<15%) (Publikacja 2).

Wyniki otrzymane metodą NGS wykazały różnice w składzie gatunkowym bakterii zasiedlających korzenie drobne w zależności od wariantu oceny. Wyróżniono siedem rodzajów bakterii *Rhizorhabdus*, *Methylotenera*, *Sphingomonas*, *Nitrosospora*, *Streptomyces*, *Methyloceanibacter*, *Niastella*, które dominowały w korzeniach z miejsc truflowych. Bakterie *Telmatobacter* sp., *Roseiarcus* sp., *Granulicella* sp., *Paludibaculum* sp., *Acidipila* sp., *Acidisphaera* sp., *Aliidongia* sp., dominowały w korzeniach z miejsc kontrolnych.

Wyniki oceny mikrobiomu owocników według metody NGS wykazały dominację przedstawicieli ośmiu rodzin, przede wszystkim Bradyrhizobiaceae, Sphingobacteriaceae, Micrococcaceae, Yersiniaceae, Sphingomonadaceae, Rhizobiaceae, Flavobacteriaceae, Comamonadaceae.

Analiza porównawcza wyników otrzymanych metodą NGS pozwoliła na wyróżnienie 67 rodzin wspólnych dla prób gleby, korzeni i owocników w trzech lokalizacjach występowania owocników trufli (analiza metagenomiczna zawarta w rozprawie, niewchodząca w treść publikacji). Licznie występowały bakterie z rodzaju *Sphingomonas*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*, *Reyranella*, *Mesorhizobium*, *Rhodoplanes*.

Przeprowadzone badania zwiększają zakres poznania preferencji występowania poszczególnych grup bakterii towarzyszących trufli letniej i ich związków z tworzeniem się owocników. Uzyskane wyniki mogą być użyteczne w wyborze i monitorowaniu miejsc sprzyjających owocnikowaniu *Tuber aestivum*.

Słowa kluczowe: gleba, korzenie, mykoryzy, owocniki trufli letniej, mikroorganizmy glebowe, aktywność metaboliczna, sekwencjonowanie: Sangera, NGS

Abstract of doctoral thesis: Identification of bacterial communities associated with natural localities of truffles *Tuber* spp.

mgr Marta Siebyła, Forest Research Institute, Sękocin Stary, Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn,

Abstract

The plant root zone is the soil layer most abundantly populated by micro-organisms, such as bacteria and fungi, and among them mycorrhizal-forming organisms that directly interact with the plant root system. It is estimated that the abundance of bacteria in the rhizosphere layer is 100 times higher, compared to sites outside it. Along with many other fungal species in stands of trees are subterranean ectomycorrhizal fungi of the truffle (*Tuber* spp.) genus.

This doctoral dissertation is a summary of a series of 5 studies aimed at understanding the role of bacterial communities in the so-called ‘truffle environment’, including soil, small roots of trees and shrubs with mycorrhizae, and the ascomata of summer truffle (*Tuber aestivum*) found there. Surveys were carried out at three selected locations, denoted further as G, M and W in the Nida Basin macro-region. The study areas were located in the previously identified separations of the occurrence of summer truffle ascomata (Hilszczańska et al., 2014, 2016, 2019), denoted in the dissertation as T (the site with truffle) and in the separations where no truffle was found, denoted as K (control). The areas with the presence of truffle ascomata, although located within the same mesoregion, nevertheless differed in terms of stand, substrate, pH and soil chemistry characteristics, allowing a broader spectrum of bacterial communities characterising ‘truffle stands’ to be known.

The chemical composition of the soil was investigated, quantitative (classical method) and qualitative (molecular method using the Sanger technique) analyses were performed (Publication 1), and the reaction DNA concentration – the number of target 16S rRNA gene fragments in soil samples – was quantified using the qPCR method, and biochemical analyses were performed on the assessment of the functional biodiversity of soil bacteria using the BIOLOG method (Publication 3).

Both the classical culture method using qualitative analyses (Sanger DNA sequencing) and the NGS method were applied. The bacterial species composition of the bacteria and the number of OTU sequences identified were determined in the dissertation by analysis of soil, roots and fruiting bodies (peridium and soil) (Publications 2, 4, 5).

Both results on the chemical composition of soils, classical, biochemical and molecular analyses of bacterial communities showed quantitative and qualitative differences between soil and root samples at sites where summer truffle fruiting bodies were present and at control sites,

as well as dissimilarity with respect to the communities inhabiting the fruiting bodies. The influence of tree growth conditions (habitat, species composition), the weather, and the season on the diversity or similarity of microbiomes was observed.

Metagenomic analysis of DNA samples isolated directly from the soil allowed to distinguish six predominant bacterial classes: *Proteobacteria* (30%–65%), *Actinobacteria* (7%–36%), *Bacteroidetes* (1%–30%), *Acidobacteria* (0.3%–30%), and *Planctomycetes* (0.2%–10%), *Chloroflexi* (2%–23%). Bacteria from the classes *Chloroflexi* and *Actinobacteria* were more abundant in the variant where summer truffle was recorded (~60%), while *Proteobacteria* and *Firmicutes* dominated in the control variant (<15%) (Publication 2).

The results obtained using the NGS method showed differences in the species composition of bacteria colonising fine roots, depending on the assessment variant. Seven bacterial genera predominated in roots from truffle sites: *Rhizorhabdus*, *Methylotenera*, *Sphingomonas*, *Nitrosospora*, *Streptomyces*, *Methyloceanibacter*, and *Niastella*. In contrast, *Telmatobacter sp.*, *Roseiarcus sp.*, *Granulicella sp.*, *Paludibaculum sp.*, *Acidipila sp.*, *Acidisphaera sp.*, *Aliidongia sp.*, predominated in roots from control sites.

The results of the evaluation of the microbiome of the fruiting bodies obtained using the NGS method showed the dominance of representatives of eight families, mainly Bradyrhizobiaceae, Sphingobacteriaceae, Micrococcaceae, Yersiniaceae, Sphingomonadaceae, Rhizobiaceae, Flavobacteriaceae, Comamonadaceae.

Comparative analysis of the results obtained by the NGS method allowed the distinction of 67 families common to soil, root and fruiting body samples in the three truffle fruiting body locations (metagenomic analysis included in the dissertation, not included in the publication). Bacteria of the genera *Sphingomonas*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*, *Reyranella*, *Mesorhizobium*, *Rhodoplanes* were found in abundance.

The study increases the scope for understanding the preference of particular groups of bacteria accompanying the summer truffle and their relationship to ascomata formation. The results obtained may be useful in selecting and monitoring sites favourable for *Tuber aestivum* fruiting bodies.

Keywords: soil, roots, mycorrhizae, summer truffle ascomata, soil microorganisms, metabolic activity, sequencing: Sanger, NGS