

## Molekularna identifikacija biokomponente gozdnih tal

### *Molecular Identification žof Forest Soil Bio-component*

Tine GREBENC<sup>1</sup>, Marko BAJC<sup>2</sup> Hojka KRAIGHER<sup>3</sup>,

#### **Izvleček:**

Grebenc, T., Bajc, M., Kraigher, H.: Molekularna identifikacija biokomponente gozdnih tal. *Gozdarski vestnik*, 70/2012, št. 1. V slovenščini z izvlečkom v angleščini, cit. lit 25. Jezikovni pregled slovenskega besedila Marjetka Šivic, angleškega besedila Breda Misja.

Gozdna tla so kompleksen sistem abiotskih in biotskih dejavnikov, ki definirajo produktivnost in delovanje ekosistema. Poznavanje pestrosti in količine organizmov lahko pomembno vpliva na analize in preračune, vezane na indikacijo v gozdu, kvantifikacijo vrst ali združb ter spremljanje dolgoživosti in preživetja izbranih taksonov ne glede na njihov taksonomski položaj. Ključni cilj molekularnih pristopov je enostavna in zanesljiva identifikacija posameznega organizma ali celotne združbe osebkov izbrane taksonomske skupine. Rezultati molekularnih pristopov so kakovostni, zanesljivi in primerni za številne nadaljnje analize, na primer za indikacijo, kvantifikacijo, spremljanje dolgoživosti in preživetja ter analiz metabolne aktivnosti v tleh. V prispevku predstavljamo najpogosteje uporabljene molekularne pristope k analizam posameznih taksonov ali celotnih združb na konkretnem primeru mikobioindikacije. Molekularne analize imajo številne možnosti rutinske obdelave in široke uporabe pri analizah biokomponente tal v gozdarstvu, konkretno tudi pri monitoringubiokomponente tal v gozdarstvu, konkretno tudi pri monitoringu biokomponente gozdnih tal v okviru monitoringa dinamike ogljika v gozdnih tleh.

**Ključne besede:** gozdna tla, biokomponenta, molekularna identifikacija, biotska pestrost na osnovi molekularne identifikacije, verižna reakcija s polimerazo (PCR), sekvenciranje DNK, denaturacijska gradientna elektroforeza (DGGE)

#### **Abstract:**

Grebenc, T., Bajc, M., Kraigher, H.: Molecular Identification of Forest Soil Bio-component. *Gozdarski vestnik (Professional Journal of Forestry)*, 70/2012, vol. 1. In Slovenian, abstract in English, lit. quot. 25. Proofreading of the Slovenian text Marjetka Šivic, proofreading of the English text Breda Misja.

Complex biotic and abiotic parameters in forest soils define soil productivity and functioning of forest ecosystems. The information on diversity and quantity of forest soil organisms is essential for any downstream analyses such as bioindication of forest ecosystems, quantification of particular species and communities. Regardless of its taxonomic position, the application of molecular approaches can indicate their presence, longevity and survival in forest soils. The aim of molecular approaches is an easy and reliable identification of individual taxa of whole communities of the forest soil bio-component. The results of molecular identification and quantification are reliable and suitable for many downstream applications, for example indication, quantification, computing of longevity or survival rate of analysed species or community and their metabolic activity in soil. As an example of application of molecular methods we present a mycobiindication approach in forest ecosystems. Obtained results and conclusions from molecular approaches can be applied also in carbon dynamics analysis and estimations in forest soils.

**Key words:** forest soil, biota, biodiversity using molecular identification, PCR, DNA sequencing, DGGE

## 1 UVOD

Gozdna tla so kompleksen sistem abiotskih in biotskih dejavnikov, ki definirajo produktivnost in delovanje ekosistema. Gozdna tla so še posebno bogata z organizmi, med katerimi se vzpostavijo različne oblike medsebojnih vplivov (rastline, glive, živali, mikroorganizmi). Te kompleksne interakcije vplivajo na kroženje hranil in stabilnost gozdnih ekosistemov (ARSO 2001). Določanje organizmov v tleh je pogosto oteženo, saj se pri številnih skupinah organizmov (predvsem rastlin in gliv) v

veliki meri v tleh pojavljajo le vegetativne oblike. Za enostavnejšo identifikacijo določitev taksonov, ki se pojavljajo v gozdnih tleh, smo v zadnjih desetletjih razvili več pristopov, ki temeljijo na analizi informativnih regij v DNK organizmov.

<sup>1</sup> T. G., dr. Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija – tine.grebenc@gozdis.si,

<sup>2</sup> M. B., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija – marko.bajc@yahoo.com

<sup>3</sup> H. K., prof. dr. Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija – Hojka.kraigher@gozdis.si

Pristopi se lahko razlikujejo glede na uporabljene metode, ciljno informacijo, kjer bodisi želimo identificirati posamezen osebek ali ovrednotiti pestrost in sestavo celotne združbe izbrane skupine organizmov. Glede na analizirane skupine in cilj analize moramo izbrati ustrezne informativne regije v genomih. Ne glede na izbran pristop molekularne metode temeljijo na primerjavah z referenčnimi bazami podatkov, zato sta uspeh in kakovost identifikacij odvisna predvsem od izbire ali priprave izbranih baz. V pričujočem prispevku želimo prikazati molekularne metode, ki jih lahko uporabljamo za identifikacijo organizmov v gozdnih tleh ter uporabo tovrstnih rezultatov na primeru indikacije stresa z mikobioindikacijo glede na analizo drobnih ektomikoriznih korenin.

## 2 METODE

Metode določanja taksonov temeljijo na nekaterih skupnih postopkih, ki se med seboj ne razlikujejo glede na analizirano skupino organizmov. Izbor sistema vzorčenja in ponovitev je ključen za zagotavljanje reprezentativnosti ter ob hkratnem standardiziranem vzorčenju tudi za medsebojno primerljivost rezultatov (KRAIGHER, 1996). Glede na nadaljnje postopke lahko iz odvzetih vzorcev izoliramo posamezne organizme ali se odločimo za pristop, v katerem hkrati izoliramo celotno populacijo ali združbo organizmov (Slika 1). V obeh primerih moramo za molekularne pristope najprej iz vzorca ekstrahirati DNK, za kar lahko uporabimo katerega izmed komercialno dostopnih kompletov za specifično prilagojenih za ekstrakcijo iz posameznih tipov vzorcev - iz rastlinskega (WESTERGREN et al., 2005) ali glivnega (GREBENC et al., 2009a) materiala; neposredno iz vzorcev zemlje in korenin; iz živalskih tkiv in izločkov (BAJC et al., 2011); itn.

V naslednjem koraku iz vzorca ekstrahirane DNK pomnožimo izbrano regijo v genomu. Pomnoževanje v verižni reakciji z encimom polimerazo (PCR) je pogoj za nadaljnje analize, saj le tako pridobimo zadostne količine kopij tarčne DNK za nadaljnje postopke. Prvi primeri pomnoževanja in tovrstnih analiz so na večjem številu ektomikoriznih vzorcev opravili pred nekaj desetletji (WHITE et al., 1990). Najpogosteje se za potrebe identifikacije pri glivah uporablja ITS

regije v ribosomalnih operanih (WHITE et al., 1990, GARDES/BRUNS, 1993), lahko pa tudi nekatere druge regije, na primer gene za beta-tubulin (GLAS DONALDSON, 1995), elongacijski faktor 1 (WANG et al., 2006) in drugo.

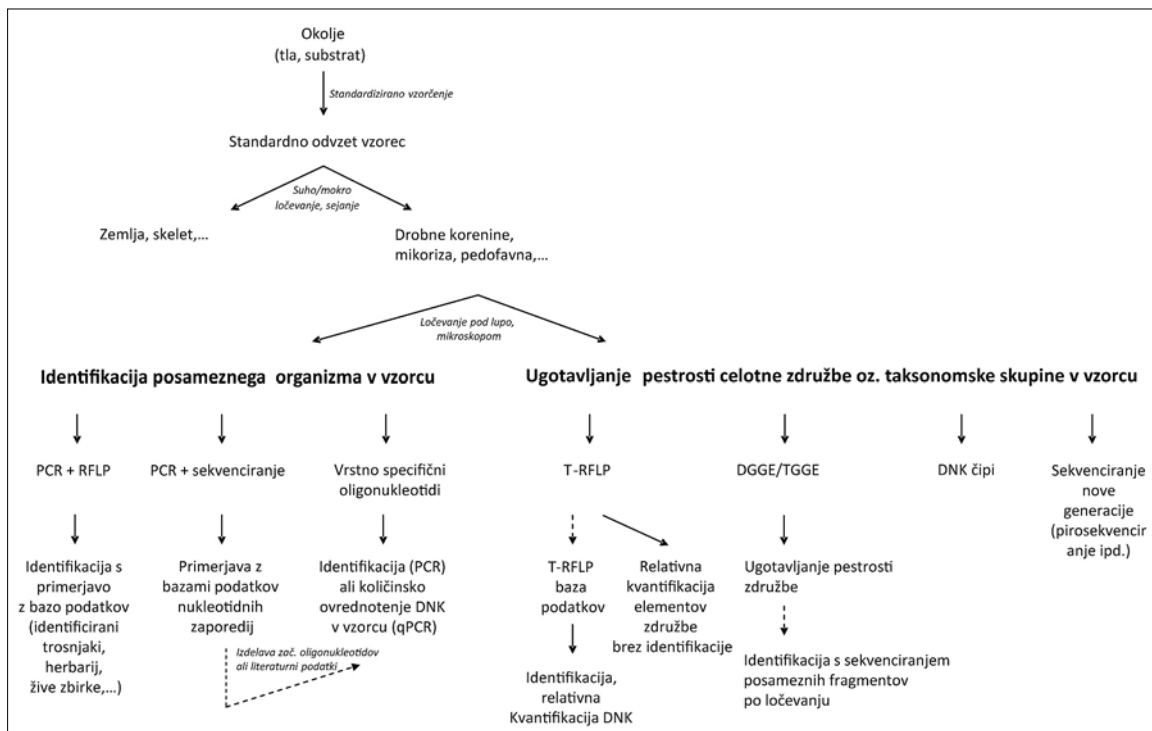
Ne glede na izbrano regijo za analize praviloma pomnožujemo izraz ni v slov. rabi večino tarčnih regij v DNK, bodisi pri posameznem organizmu v vzorcu ali celotni združbi. Glede na način priprave vzorca lahko izbiramo nadaljnje pristope (Slika 1).

Pri analizi posameznega taksona iz vzorca najpogosteje uporabljamo cenovno sprejemljiv pristop s primerjavo dolžin fragmentov po razrezu pomnožene z encimi restriktažam (RFLP) (GREBENC et al., 2000) ali informativnejši pristop s sekvenciranjem celotne pomnožene regije DNK. Pogoj za analizo posameznega taksona v vzorcu je njegova predhodna izolacija, ki je lahko dolgotrajna, na primer pri ektomikoriznih glivah.

Da bi se izognili izolacijam posameznega taksona iz vzorca, lahko uporabimo več molekularnih pristopov, s katerimi na temelju prisotnih molekul DNK v ekstraktu vzorca določamo pestrost celotne združbe ali taksonomske skupine. Na Gozdarskem inštitut Slovenije iz slednje skupine metod rutinsko uporabljamo DGGE (analiza pomnoženih fragmentov DNK) z poliakrilamidno gelsko elektroforezo v gradientu denaturantov (GREBENC et al., 2006, 2009b). Drugi pogosteje uporabljeni pristopi analiz združb so TGGE (analiza pomnoženih fragmentov DNK z denaturirajočo temperaturno gelsko elektroforezo) in T-RFLP (analiza restrikcijskega polimorfizma dolžine končnih fragmentov). Pristopa z uporabo čipov DNK (vključno s t. i. »barcoding«), pri kateri z uporabo kratkih referenčnih genetskih markerjev v DNK neznanega organizma identificiramo njegovo vrsto (KRESS et al., 2005) in uporaba sekvenciranja nove generacije (t. i. pirosekvenciranje; ugotavljanje zaporedja nukleotidov glede na detekcije sproščanja pirofosfata ob vgradnji nukleotidov v nastajajočo verigo DNK (RONAGHI, 2001)) pa sta finančno še vedno težje dosegljiva, kljub veliki informativnosti rezultatov.

## 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Ključni cilj molekularnih pristopov je preprosta in zanesljiva identifikacija posameznega organizma ali celotne združbe osebkov izbrane taksonomske



Slika 1: Najpogostejši molekularni pristopi pri identifikaciji biokomponente (organizmov) v vzorcih gozdnih tal. (Opomba: črke na skici so premajhne in nečitljive)

Figure 1: The most common approaches in molecular identification of living organisms in forest soil samples.

skupine v analiziranih vzorcih. Molekularne pristope pri identifikaciji biokomponente v vzorcih gozdnih tal praviloma uporabljamo kot dopolnilno ali edino metodo analize taksonov in združbe. Z uporabo molekularnih metod lahko kot končni rezultat dobimo identifikacijo do vrste, predvsem, pogosto pa ne, oziroma je identifikacija mogoča zgolj na višjih taksonomskih enotah, zaradi pomanjkljivosti v medmrežnih bazah podatkov, ki jih uporabljamo za identifikacijo. Analize posameznega taksona na nivoju nukleotidnega zaporedja omogoča nadaljnje analize sorodstvenih odnosov in razdalj do bližnjih sorodnikov, kar lahko uporabimo kot dodaten pristop za izboljšanje zanesljivosti identifikacije taksona. Na primeru ektomikoriznih gliv največkrat uporabljamo filogenetska drevesa, pripravljena na ravni rodu, kar omogoča zanesljivejšo identifikacijo ali nakazuje na prisotnost novih, še ne opisanih vrst (ŠTRAUS, 2010, ŠTRAUS et al., 2011). Prav tako uspešno lahko z omenjenimi molekularnimi pristopi do

vrste identificiramo in kvantificiramo tudi druge talne organizme (GREBENC/KRAIGHER, 2006).

Čim boljša identifikacija elementov združbe je bistvena, saj je znano, da na primeru ektomikoriznih gliv velja, da micelijske mreže zagotavljajo časovno in prostorsko prerazporejanje hranil in vode med viri in porabniki. Funkcionalna pestrost in kompatibilnost v združbi sta vrstno/skupinsko specifični, zato je poznavanje vpletenih organizmov nujno za prepoznavanje celotne taksonomske in funkcionalne pestrosti gozdnega ekosistema (GIANINAZZI-PEARSON, 1984, READ 1998).

Ne glede na to, ali so posamezen takson v združbi določili do vrste ali le do višjih taksonomskih enot, podatke lahko uporabimo v nadaljnjih analizah, med katerimi se je v gozdnih ekosistemih izkazala za uporabno in učinkovito mikobioindikacija stresa (KRAIGHER et al., 1996). Stres je definiran kot pomembna sprememba dejavnikov v okolju glede na optimalne razmere za rast, ki povzroči spremembe in odgovore na vseh funkcio-

nalnih ravneh določenega organizma (LARCHER, 1995). Organizme ali združbe organizmov, ki reagirajo na vplive iz okolja s spremembo njihovih vitalnih funkcij in/ali kemijsko sestavo in lahko iz te reakcije sklepamo o stanju v njihovem okolju, imenujemo bioindikatorji (Arndt et al., 1987). Kot primer uporabe smo v več analizah preverili indikatorske vrednosti ektomikoriznih vrst gliv in ugotovili, da so nekatere vrste občutljive za posamezen stresni dražljaj, druge odporne (KRAIGHER et al., 1996, CUDDLIN et al., 2007, KRAIGHER et al., 2007, KRAIGHER/AL SAYEGH PETKOVŠEK, 2011). Za več vrst lahko statistično dokažemo značilno pojavljanje vzdolž gradienta nekega dejavnika, na primer koncentracije hranil v tleh (GREBENC et al., 2009a) ali odzivanje na prisotnost polutanta, na primer atmosferskega ozona (GREBENC/KRAIGHER, 2007a, b).

#### 4 ZAKLJUČEK

Gozdna tla so kompleksen sistem, v katerem tesno skupaj in v interakcijah najdemo predstavnike vseh kraljestev organizmov. V okviru metod monitoringa dinamike ogljika v biokomponenti tal molekularno genetskih pristopov rutinsko še nismo izvajali, saj gre za relativno nove in v gozdarski praksi še manj uveljavljene pristope. Za rutinske analize biokomponente gozdnih tal bi bile primerne predvsem metode, ki temeljijo na hkratni analizi celotne združbe izbrane taksonomske skupine, na primer združba drobnih korenin lesnatih rastlin v izbrani plasti tal, združba mikoriznih gliv in podobno. Tovrsten pristop bi lahko z relativno majhnimi stroški aplikirali uporabili na večjem številu ploskev in v več ponovitvah. Drugi pristop rutinskega monitoringa biokomponente gozdnih tal bi usmerili v iskanje oziroma potrjevanje prisotnosti točno določene vrste talnih organizmov (vrsta glive ali pripadnost korenine drevesni vrsti, bakterije, pedofavna ...), za katere poznamo njihov indikatorski pomen ali druge pomene za gozdni ekosistem ali človeka. S tovrstnimi analizami bi v talnih vzorcih iskali prisotno DNK omenjenih izbranih vrst s pomočjo lovka DNK (v PCR). Dodatno lahko tudi kvantificiramo količino prisotne DNK izbrane vrste v vzorcu z uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov v

t. i. kvantitativnem PCR. Molekularne metode omogočajo širok in od morfologije organizmov neodvisen pristop študije združb in posameznih taksonov. Kot take so pri analizah biokomponente lahko pomemben vir informacij za več nadaljnjih analiz in preračunov, na primer za indikacijo, kvantifikacijo, spremljanje dolgoživosti in preživetja ter analiz metabolne aktivnosti v tleh.

#### 5 VIRI

- ARSO (Agencija Republike Slovenije za okolje), 2001. Pregled stanja biotske raznovrstnosti in krajinske pestrosti v Sloveniji. 2. Del: Stanje biotske raznovrstnosti in krajinske pestrosti. (Ur.: HLAD, B. / SKOBERNE, P.).- Ljubljana Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije, Agencija RS za okolje, 100 s.
- BAJC, M./ČAS, M./BALLIAN, D./KUNOVAC, S./ZUBIČ, G./GRUBEŠIČ, M./ZHELEV, P./PAULE, L./GREBENC, T./KRAIGHER, H., 2011. Genetic differentiation of *Tetrao urogallus* L. highlights the importance of South-Eastern Europe for understanding phylogeography of the species. PLOS (oddano).
- GREBENC, T./KRAIGHER, H., 2006. 4.3 Identification of single species and communities : identification and characterisation of types of ectomycorrhiza.- V: Handbook of methods used in rhizosphere research. Birmensdorf, Swiss Federal Research Institute, s. 450–451.
- KRAIGHER, H./AL SAYEGH-PETKOVŠEK, S./GREBENC, T./SIMONČIČ, P., 2007. Types of ectomycorrhiza as pollution stress indicators : case studies in Slovenia.- Environmental Monitoring and Assessment, 128, 1, s. 31–45.
- KRAIGHER, H./AL SAYEGH PETKOVŠEK, S., 2011. Mycobioidication of stress in forest ecosystems. V: Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae, Heidelberg; New York, Springer, s. 301–322.
- KRESS, W.J./WURDACK, K. J./ZIMMER, E. A./WEIGT L. A./JANZEN D. H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS USA, 102, 23, s. 8369–74.
- RONAGHI, M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Research 11, 1, s. 3–11.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., 1984. Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. V: Genes Involved in Microbe Plant Interactions: Advances In Plant Gene Research, Basic Knowledge and Application, New York, Springer-Verlag, s. 225–253.
- GLASS, N. L./DONALDSON, G. C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify

- conserved genes from filamentous ascomycetes.- Applied and Environmental Microbiology, 61, 4, s. 1323–1330.
- GREBENC, T./BAJC, M./KRAIGHER, H., 2009b. Wood decomposition and the biodiversity of wood decomposing fungi and bacteria in natural beech stands.- V: Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi, (Studia forestalia Slovenica, 135), Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 47–54.
- GREBENC, T./CHRISTENSEN, M./VILHAR, U./ČATER, M./MARTIN, M. P./SIMONČIČ, P./KRAIGHER, H., 2009a. Response of ectomycorrhizal community structure to gap opening in natural and managed temperate beech-dominated forests. Canadian Journal of Forest Research, 39, 7, s. 1375–1386.
- GREBENC, T./AL SAYEGH-PETKOVŠEK, S./POKORNY, B./KRAIGHER, H., 2006. Detection of point mutations in selected genome regions from sporocarps of heavy metal exposed *Hydnum repandum* and *Clitocybe nebularis* as putative indicator species. V: 4. slovenski simpozij o rastlinski biologiji z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 12.–15. september 2006, Knjiga povzetkov. Ljubljana, Društvo za rastlinsko fiziologijo Slovenije, s. 152–153.
- GREBENC, T./KRAIGHER, H., 2007a. Changes in the community of ectomycorrhizal fungi and increased fine root number under adult beech trees chronically fumigated with double ambient ozone concentration. Plant Biology 9, 2, s. 279–287.
- GREBENC, T./KRAIGHER, H., 2007b. Types of ectomycorrhiza of mature beech and spruce at ozone-fumigated and control forest plots.- Environmental Monitoring and Assessment, 128, 1, s. 47–59.
- GREBENC, T./PILTAVER, A./KRAIGHER, H., 2000. Establishment of a PCR-RFLP library for basidiomycetes, ascomycetes and their ectomycorrhizae on *Picea abies* (L.) Karst. Phyton, 40, 4, s. 79–82.
- ŠTRAUS, I./BAJC, M./GREBENC, T./MALI, B./KRAIGHER, H., 2011. Tipi ektomikorize pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v rizotronih. Zbornik Gozdarstva in Lesarstva (oddano).
- KRAIGHER, H./BATIČ, F. / AGERER, R., 1996. Types of ectomycorrhizae and mycobioindication of forest site pollution. Phyton 36, 3, s. 115–120.
- LARCHER, W., 1995. Physiological plant ecology. Plants under stress. Austria, Springer, 513 s.
- ŠTRAUS, I., 2010. Tipi ektomikorize pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v rizotronih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, 107 s.
- ARNDT, U./NOBEL, W./SCHWEIZER, B., 1987. Bioindikatoren. Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse.- Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag, 388 s.
- WANG Y./TANM, Z. M./ZHANG, D. C./MURAT, C./JEANDROZ, S./LE TACON, F., 2006. Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. FEMS Microbiology Letters, 259, s. 269–281.
- WESTERGREN, M./BOŽIČ, G./KRAIGHER, H., 2005. Razvoj molekularne baze podatkov za smreko in možnost razlikovanja treh provenienc na podlagi molekularnih markerjev. Gozdarski Vestnik, 63, 9, s. 355–364.
- CUDLIN, P./KIELISZEWSKA-ROKICKA, P. B./RUDAWSKA, M./GREBENC, T./ALBERTON, O./LEHTO, T./BAKKER, M. R./BORJA, I./KONOPKA, B./LESKI, T./KRAIGHER, H./KUYPER, T. W., 2007. Fine roots and ectomycorrhizas as indicators of environmental change. Plant Biosystems, 141, 3, s. 406–425.
- FINER, L./HELMISAARI, H. S./LÖHMUS, K./MAJDI, H./BRUNNER, I./BØRJA, I./ELDHUSET, E./GODBOLD, D./GREBENC, T./KONOPKA, B./KRAIGHER, H./MÖTTÖNEN, M. R./OHASHI, M./OLEKSYN, J./OSTONEN, I./URI, V./VANGUELOVA, E., 2007. Variation in fine root biomass of three European tree species: Beech (*Fagus sylvatica* L.), Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Plant Biosystems, 141, s. 394–405.
- WHITE, T. J./BRUNS, T./LEE, S./TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols. A guide to methods and applications, San Diego, USA, Academic Press, s. 315–322.