

HOSSZÚ IDŐTARTAMÚ MONOKULTÚRÁS TERMESZTÉSBŐL ÉS KÜLÖNBÖZŐ VETÉSFORGÓ RENDSZEREKBŐL SZÁRMAZÓ NÖVÉNYEK ARBUSZKULÁRIS MIKORRHIZA (AM) GOMBA-KÖZÖSSÉGEINEK VIZSGÁLATA

SASVÁRI Zita, FRANCO MAGURNO, POSTA Katalin

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Növényvédelmi Intézet,
Mikrobiológia és Környezet-toxicológiai csoport,
2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1., e-mail: Sasvari.Zita@mkk.szie.hu

Kulcsszavak: arbuszkuláris mikorrhiza, vetésforgó, monokultúra, kukorica (*Zea mays* L.), diverzitás

Összefoglalás: Napjainkban egyre inkább előtérbe kerülnek olyan környezetkímélő növénytermesztési technológiák, melyek biztosítják a műtrágya és növényvédőszer mennyiségének csökkentését a termés hozamának és minőségének megtartása mellett. Az arbuszkuláris mikorrhiza gombák, melyek a szárazföldi növények többségével, köztük termesztett növényeink nagy részével is képesek szimbiózisban élni, kulcsfontosságúak lehetnek ebben a folyamatban. Az eltérő agrotechnikai eljárások azonban befolyásolhatják a talaj természetes AM gomba-közösségeinek összetételét, így például az intenzív mezőgazdasági művelés, a peszticidek használata csökkentheti az AM gombák diverzitását. Ezért célunk volt az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet kísérleti területén, Martonvásáron beállított hosszú időtartamú monokultúras termesztésből és különböző vetésforgó rendszerekből (3 év lucerna/5 év kukorica, 2 év búza/2 év kukorica, valamint kukorica/tavaszi árpa/borsó/búza [Norfolk típus]) származó növények (főképpen kukorica – *Zea mays* L.) AM gomba-közösségeinek vizsgálata és összehasonlítása. Vizsgálataink a növények rizoszféra-talajainak AM gomba-spóraszám meghatározására, a mikorrhizáltsági százalékok becslésére, a növények gyökerét aktívan kolonizáló AM gombák molekuláris technikával (a 18S rRNS gének konzervatív régióira tervezett indítószekvenciákkal kivitelezett nested-PCR eljárással) történő azonosítására, valamint az AM gomba-közösségek filogenetikai viszonyainak feltárására irányultak. A kukorica monokultúrában és a vetésforgó rendszerekben is igazoltuk az AM gyökérkolonizáció és a talajban lévő AM gomba-spórák számának a növények vegetációs periódusaival történő változását. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a vizsgált közel 50 éves tartamhatású kísérleti háttérrel rendelkező kukorica monokultúra igen gazdag AM gomba-közösséggel rendelkezik, melynek összetétele jelentősen eltér a vetésforgóban termesztett növények AM gomba-közösségeinek összetételétől.

Bevezetés

A mikorrhiza szó a görög „mykes”(gomba) és „rhiza” (gyökér) szóösszetételből származik (FRANK 1885), jelentése: „gombagyökér”. Mind a mai napig ezt a fogalmat használjuk a növények gyökere és gombák között kialakult speciális szimbiotikus kapcsolatra. Az arbuszkuláris mikorrhiza az egyik legősibb és legerjedtebb mikorrhiza-típus. Az AM gombák a szárazföldi növényfajok 80–90%-val (feltételezeten több mint 200 000 növényfajjal) képesek szimbiotikus kapcsolatot kialakítani (SMITH és READ 2008). A gyökérkapcsoltság mindkét fél számára kedvező: a gombapartner a növénytől kész tápanyagokat kap, cserébe a növény a gombapartner kiterjedt hifahálózatának köszönhetően több vízhez és ásványi anyaghoz jut (SMITH és READ 1997). A mikorrhizált növény ellenállóbb a só-, szárazság- (AUGÉ et al. 2008) és nehézfém okozta stresszel szemben (GILDON és TINKER 1983, LEYVAL et al. 1997, HILDEBRAND et al. 2007), emellett az AM gomba közvetve, vagy közvetlenül fokozza a növénypartner kórokozókkal és kártevőkkel szembeni ellenállóságát is (AZCON-AGUILAR és BAREA 1996, POZO és AZCN-AGUILAR 2007). A mezőgazdasági haszonnövényeknél még hangsúlyosabb szerepet

kap ez a kapcsolat, mivel stressz-helyzetben elősegíti a növények fejlődését, csökkentheti a talajunság kockázatát és a gyökerek tápanyag-hasznosításának javításával mérsékelhető a felhasznált műtrágya mennyisége.

Magyarországon ez idáig 163 növényfaj mikorrhizáltságára vonatkozóan publikáltak adatokat (KOVÁCS 2008). Ezek néhány kivételével (LANDEWHR et al. 2002, FÜZY et al. 2008, KOVÁCS et al. 2007) főképpen státusz-, és az ektomikorrhiza gomba közösség megismerésére irányuló vizsgálatok voltak, és természetes élőhelyek növényfajait tartalmazták. A termesztésbe bevont növényfajok AM gomba közösségeiről csak nagyon kevés információval rendelkezünk. Az Európa mezőgazdaságában kiemelt szerepet betöltő kukorica növény AM gomba-közösségében bekövetkező változások molekuláris vizsgálatára eddig elsősorban a trópusi területeken került sor, míg Magyarországról spóra morfológiai vizsgálatokon alapuló diverzitás vizsgálatokat (SZÉCSI et al. 1989, TAKÁCS et al. 2000) vagy a különböző szintű nitrogén utánpótlás mikorrhizációs kolonizációra gyakorolt hatásvizsgálatokat (TAKÁCS és VÖRÖS 1998) ismerünk.

Az olyan egyedi jellegű kísérletek, mint például az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet kísérleti területén, Martonvásáron is beállított tartamkísérletek, kiváló lehetőséget nyújtanak annak tanulmányozására, hogy a különböző agrotechnikai tényezők – így a Magyarországon is leggyakrabban alkalmazott termesztési és talajhasználati eljárások – hosszú távon milyen hatással vannak a talajban élő mikroorganizmusok diverzitására. Így munkánk során célul tűztük ki hosszú időtartamú kukorica monokultúrából, 3 év lucerna/5 év kukorica és 2 év búza/2 év kukorica vetésforgókból származó kukorica növények, valamint kukorica/tavaszi árpa/borsó/búza (Norfolk típusú) vetésforgóból származó búza növények AM gomba-közösségeinek vizsgálatát és összehasonlítását.

Anyag és módszer

Növénymintáink az 1950-es évek végén és az 1960-as évek elején Györfly Béla és munkatársai által a MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet kísérleti területén, Martonvásáron beállított tartamkísérletekből származtak. A tartamkísérletek talaja a szántott rétegben enyhén savanyú, felvehető foszforral gyengén és káliummal jól ellátott humuszos vályog, típusa erdőmaradványos csernozjom. Kukorica monokultúrából (CRM), 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, 4 ismétlésben. A mintavételezéseket 2008 júniusában, júliusában, augusztusában és októberében végeztük.

A szobahőmérsékleten tömegállandóságig szárított 5-5 gramm talajmintákból „nedves szitálást” és flotációs eljárást (GERDEMANN és NICOLSON 1963) követő cukorsűrűség-gradiens centrifugálással (IANSON és ALLEN 1986) izoláltuk az AM gomba spórákat, majd sztereomikroszkóp alatt, 100-szoros nagyítással meghatároztuk a talaj 1 grammjára vonatkoztatott spóraszámot. A gyökérkolonizáció mértékének meghatározásához minden egyes növényegyed gyökérzetéről reprezentatív mintaként 5 különböző (összesen 1,5 g nedves tömegnek megfelelő) gyökérrészt gyűjtöttünk, melyek festését tinta ecetsavas módszerrel végeztük (VIERHEILIG et al. 1998). A mikorrhizáltsági százalékok becslését (a gyökéren belüli képletek vizsgálata nélkül) szintén sztereomikroszkóp alatt,

100-szoros nagyítással végeztük ún. „gridline intersection” módszerrel (GIOVANNETTI és MOSSE 1980), négy ismétlésben.

A molekuláris munkák során a júniusi és az augusztusi mintavételi időpontokhoz tartozó növényi gyökerek 5 különböző laterális gyökérrészből végeztünk DNS izolálást ($2 \times 4 \times 4 \times 5 = 160$) a Qiagen által forgalmazott DNeasy® plant Mini Kit-tel. Az AM gomba 18S rDNS gén egy részének nested-PCR amplifikálását, első lépésben AMV4.5F-AMV4.5R eukarióta, majd második lépésben AMV4.5NF-NR AM gomba specifikus indítószekvenciákkal végeztük (SAITO et al. 2004). A kapott PCR amplifikátumokat agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki és választottuk el, 2%-os agaróz gélen, $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$ etidium-bromid jelenlétében. Az agaróz gélből a megfelelő méretű (~650 bp) fragmenteket GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit-tel (GE Healthcare, Amersham Biosciences) visszaizoláltuk, az ugyanazon kezelésekhöz és mintavételi időpontokhoz tartozó PCR fragmenteket a továbbiakban együtt kezeltük – RENKER et al. (2006) módszere alapján, egy „pool”-ban – és pGEM®-T Easy Vector System-mel (Promega) a gyártó cég utasításai szerint pGEM®-T Easy vektorba (3015 bp) építettük, majd *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáltuk.

A lehetséges pozitív klónokból plazmid minipreparátumot tisztítottunk Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit-tel (Promega). A kinyert plazmidok nukleotid sorrendjének meghatározása a klónozó hely egyik oldaláról kiindulva T7 primerrel, az IIT Biotech szekvenáló laboratóriumában (Bielefeld, Németország) ABI 3130XL (Applied Biosystems) szekvenátorral történt. A Glomeromycota szekvenciák elérhetőek az NCBI (National Centre for Biotechnology Information) adatbázisában a GU810537-GU810731 azonosító kódok alatt.

A kapott szekvenciák javítását követően Mothur programmal 97%-os hasonlósági szinten elkülönítettük a molekuláris filogenetika alapján együtt kezelendő taxonómiai egységeket, a MOTU-kat (Molecular Operational Taxonomic Unit). Minden egyes MOTU-ból egy reprezentatív szekvenciát választottunk és összevetettük a Maarjam Glomeromycota adatbázissal (<http://maarjam.botany.ut.ee/>). A legnagyobb szekvencia-azonosságot mutató virtuális taxonokból egy-egy szekvenciát választottunk referenciaként a filogenetikai elemzésekhez. A filogenetikai fa készítését a CIPRES web-portálon keresztül a RAxML 7.3.0. programmal végeztük (MILLER et al. 2010) Maximum Likelihood/rapid bootstrapping módszerrel. A mikorrhizáltsági adatok statisztikai elemzését lineáris modellezéssel végeztük az R Statisztikai Szoftver 2.13.2. –es verziójával (R Development Core Team 2011; <http://www.r-project.org/>).

Eredmények

Gyökérkolonizáció és a rizoszféra-talajok AM gomba spóraszám

A kukorica monokultúrából és a vetésforgó rendszerekből származó növények átlag gyökérkolonizációs értékeit, valamint rizoszféra-talajainak 1 grammjára vonatkoztatott átlag AM gomba spóraszámait az 1. táblázat foglalja össze.

A legalacsonyabb kolonizációs százalékokat júniusban (CRM: 23,75% – CR7: 41%) a virágzásban lévő kukorica és a teljes érésben lévő búza gyökereken, valamint októberben a tarlókból származó kukorica és a búza gyökereken mértük (CRM: 35,75% – CR7: 43,75%). A Norfolk típusú (CR7) vetésforgóból származó búza növények gyökérkolo-

nizációjának értékei – melyek a búza viaszérésében és a sárgulásában elérték a 61,25% és a 60,50%-ot is – szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0,01$) a monokultúrában termesztett kukorica növények gyökérkolonizációs értékeihez képest minden mintavételi időpontban. Júliusban a lucerna-kukorica és a búza-kukorica vetésforgó rendszerekből szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) átlagos gyökérkolonizációs százalékokat (43,88% és 41%) kaptunk, a kukorica monokultúrából származó növények átlagos gyökérkolonizációs értékéhez (51,25%) képest.

1. táblázat A kukorica monokultúra és a 3 év lucerna/5 év kukorica, 2 év búza/2 év kukorica vetésforgókból származó kukorica növények, valamint a Norfolk típusú vetésforgóból származó búza növények átlagos gyökérkolonizációja (A) és rizoszféra-talajainak 1 grammjára vonatkoztatott átlagos AM gomba spóraszám (B)

Table 1. Colonization of maize (in case of Norfolk wheat) roots by AM fungi (A) and spore number per gram of soil (B) as affected by sampling time and crop sequence (corn monocropping, 3 yrs alfalfa/5 yrs corn, 2 yrs corn/2 yrs wheat, corn/spring barley/peas/ wheat)

Gyökérkolonizáció (%)				
	Június	Július	Augusztus	Október
Kukorica monokultúra	29,50 ± 2,78	51,25 ± 2,99	51,00 ± 3,16	35,75 ± 4,19
3 év lucerna/5 év kukorica	23,75 ± 3,30	43,87 ± 4,01	52,50 ± 5,74	37,75 ± 4,92
2 év búza/2 év kukorica	30,75 ± 4,57	41,00 ± 2,16	47,00 ± 3,83	38,75 ± 2,50
Norfolk típus	41,00 ± 6,58	61,25 ± 6,08	60,50 ± 3,79	43,75 ± 5,91

Spóraszám (db g ⁻¹ talaj)				
	Június	Július	Augusztus	Október
Kukorica monokultúra	2,00 ± 0,82	10,00 ± 2,94	13,50 ± 1,29	24,50 ± 1,29
3 év lucerna/5 év kukorica	3,00 ± 2,16	11,00 ± 0,82	11,50 ± 1,29	15,50 ± 3,51
2 év búza/2 év kukorica	0,00 ± 0,00	5,50 ± 1,29	11,50 ± 3,51	8,00 ± 4,08
Norfolk típus	0,00 ± 0,00	12,50 ± 4,65	11,50 ± 1,29	14,00 ± 0,82

Júliusban a kukorica monokultúrából származó kukorica növények rizoszféra talajaira átlagosan 10 db spóra g⁻¹ talaj volt jellemző, ekkor a búza-kukorica vetésforgóból mutattunk ki ennél szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) átlagos AM gomba spóraszámot (5,5 db spóra g⁻¹ talaj). Októberben minden rotációs rendszerből szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,001$) spóraszámot mutattunk ki, mint a kukorica monokultúrából, ahol ekkor átlagosan 24,5 db AM gomba spóra volt jellemző a rizoszféra-talajok 1 grammjában.

Az AM gomba-közösségek filogenetikai elemzése

A kukorica monokultúra és a 3 év lucerna/5 év kukorica, 2 év búza/2 év kukorica vetésforgókból származó kukorica növények, valamint a kukorica/tavaszi árpa/borsó/búza (Norfolk típusú) vetésforgóból származó búza növények AM gomba-közösségeinek molekuláris elemzése két időpontban, júniusban valamint augusztusban történt. Összesen 340 klón (42-44 klón/termesztési rendszer/időpont) nukleotid sorrendjét határoztuk meg, melyből 179 AM gomba szekvencia került további elemzésre. A 179 Glomeromycota szekvencia szerkesztését követően Mothur programmal 17 MOTU-t sikerült elkülönítenünk. A filogenetikai elemzésbe (nem bemutatott ábra) a Mothur programmal 97% hasonlósági szinten elkülönített 17 MOTU egy-egy reprezentáns képviselőjét és az ezekkel legmagasabb szekvencia-azonosságot mutató virtuális taxonokból egy-egy főbb taxonómiai egységet reprezentáló leírt faj szekvenciáit vontuk be. A filogenetikai elemzés

eredményeképpen 12 MOTU (a szekvenciák 91%-a) a Glomeraceae (korábbi *Glomus* Group A), 3 (4%) a Claroideoglomeraceae (korábbi *Glomus* Group B), 1 (1%) a Diversisporaceae és 1 (4%) a Paraglomeraceae családokhoz tartozott. A Glomeraceae családon belül a szekvenciák 32,52%-a a *Rhizophagus*, 1,23%-a a *Sclerocystis* nemzetségbe (ezek a korábbi *Glomus* Group Ab), 5,52%-a a *Funneliformis*, 17,79% a *Septoglomus* nemzetségbe (ezek a korábbi *Glomus* Group Aa), 1,84%-a a *Glomus* Group Ad „fajcsoporthoz”, és 41,10%-a a Glomeraceae család bizonytalan rendszertani pozícióval rendelkező *sensu lato Glomus* nemzetségének tagjaihoz tartozott. A szekvenciák eloszlását a MOTU-kban, valamint a MOTU-k százalékos eloszlását a Glomeromycota szekvenciák között a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A szekvenciák eloszlása a Mothur programmal 97%-os hasonlósági szinten elkülönített MOTU-kban. Jelölések: kukorica monokultúra (CRM), 3 év lucerna/5 év kukorica (CR3), 2 év búza/2 év kukorica (CR5), kukorica/tavaszi árpa/ borsó/búza (Norfolk típusú, CR7) vetésgörögök (vizsgált növények: CRM, CR3 és CR5 – kukorica, CR7 – őszi búza)

Table 2. Distribution of the AMF sequences in the MOTUs distinguished on a similarity level of 97%.

Symbols: CRM: corn monocropping, CR3: 3 yrs alfalfa/5 yrs corn, CR5: 2 yrs corn/2 yrs wheat and CR7: corn/spring barley/peas/ wheat crop rotation systems. (plants studied: CRM, CR3 and CR5 – maize, CR7 – winter wheat)

AM gomba nemzetség	Kezelések és mintavételi időpontok								Σ (n) %	
	CR3		CR5		CR7		CRM			
	Jún.	Aug.	Jún.	Aug.	Jún.	Aug.	Jún.	Aug.		
<i>Paraglomus</i>										
MOTU 02	4	-	3	-	-	-	-	-	7	3,91
<i>Diversispora</i>										
MOTU 03	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1,12
<i>Funneliformis</i>										
MOTU 04	2	-	-	-	5	-	-	2	9	5,03
<i>Septoglomus</i>										
MOTU 05	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,56
MOTU 06	-	-	1	-	-	-	1	-	2	1,12
MOTU 07	-	-	8	-	-	-	10	8	26	14,53
<i>sensu lato Glomus</i>										
MOTU 08	-	-	-	-	-	-	2	-	2	1,12
MOTU 09	-	-	-	-	2	-	1	-	3	1,68
MOTU 10	-	-	1	-	4	-	-	-	5	2,79
MOTU 11	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,56
MOTU 12	16	19	8	13	2	1	-	-	59	32,96
<i>Rhizophagus</i>										
MOTU 13	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0,56
MOTU 14	2	2	4	12	10	19	3	-	52	29,05
<i>Sclerocystis</i>										
MOTU 15	2	-	-	-	-	-	-	-	2	1,12
<i>Claroideoglomus</i>										
MOTU 16	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,56
MOTU 17	1	1	-	-	-	-	-	-	2	1,12
MOTU 01	1	1	-	-	1	-	-	1	4	2,23
Total (n)	29	23	25	25	24	20	19	14	179	100

A legtöbb szekvenciát (32,96%) magába foglaló MOTU 12 a MaarjAM adatbázisban megtalálható 143-as virtuális taxonnal (VTX00143) mutatott legmagasabb azonosságot, amihez morfortípust nem tudunk hozzá rendelni, de ide tartozik a Glo4 filotípus. A Glomeromycota szekvenciák 29,5%-a a MOTU 14-ben foglalt helyet, mely a VTX00113 (*Rhizophagus intraradices* és a *R. fasciculatum* izolátumokat tartalmazó) virtuális taxonnal állt szoros filogenetikai rokonságban. A harmadik legtöbb szekvenciát (14,53%) tartalmazó MOTU 07 pedig a *Glomus viscosum* BEG 126 izolátumot képviselő VTX00063 virtuális taxonhoz tartozott, mely a *Septoglomus constrictum* morfortípust képviselő VTX00064 taxonnal együtt a *Septoglomus* nemzetségben helyezkedik el.

Kukorica monokultúrából összesen 11 MOTU-t, a 3 év lucerna/5 év kukorica vetésforgóból 8 MOTU-t, a 2 év búza/2 év kukorica valamint a kukorica/tavaszi árpa/borsó/búza (Norfolk típusú) vetésforgó rendszerekből 6–6 MOTU-t mutattunk ki.

Eredmények megvitatása

A gyökérekolonizáció kialakulását és mértékét, illetve az AM gomba-spóráképződést számos biotikus és abiotikus tényező, valamint antropogén hatás befolyásolja. Ezek közül legfontosabbak a talaj fizikai és kémiai tulajdonságai, így a talaj pH-ja, foszfor- és szervesanyag-tartalma, a gazdanövény és az aktív gyökérekolonizációt kialakító, illetve abban részt vevő AM gombafajok rendszertani hovatartozása (CARRENHO et al. 2001). Emellett a szimbiózis kialakulása és fenntartása valószínűleg a két partner együttes irányítása alatt áll, melynek molekuláris háttere még nem teljesen tisztázott (PARKINSKE 2008). Az, hogy a különböző AM gombafajok eltérő mértékben alakítanak ki a növényekkel kapcsolatot, többek között – a növénytől kapott szénhidrát mennyiségére vonatkozóan – eltérő mértékű szénhidrát igényüknek is köszönhető (VIERHEILIG et al. 2008). A gyökérekolonizáció meghatározása tehát az AM gombák jelenlétének kimutatására és a szimbiotikus kapcsolat mértékének megállapítására alkalmas, arról azonban nem nyújt információt, hogy az aktív szimbiotikus kapcsolatban mely AM gombák vesznek részt. A rizoszféra-talajokban jelenlévő AM gomba-spórák sem adnak információt erről, hiszen néhány AM gombafaj a gyökéren belül, vagy egyáltalán nem sporulál (BEVER et al. 1996). Ezért a növények gyökerét aktívan kolonizáló AM gombaközösség tagjainak azonosítását és az AM gombaközösség filogenetikai viszonyainak feltárását molekuláris technikával végeztük.

Gyökérekolonizáció és a rizoszféra-talajok AM gomba spóraszám

A gyökérekolonizációs értékek vonatkozásában a kukorica monokultúra (CRM) a vetésforgó rendszerekkel összevetve összességében második helyen állt a Norfolk típusú vetésforgó után, míg a rizoszféra-talajokban októberre képződő AM gombaspóra számok tekintetében egyértelműen első helyet foglalta el. A Norfolk típusú vetésforgó búza növényeinek szignifikánsan magasabb gyökérekolonizációs értékei valószínűleg a megelőző növény (borsó) hatásának köszönhetőek (JEFWA et al. 2006, MATHIMARAN et al. 2005), másrésről az őszi búza fenológiai fázisai időben jóval megelőzik a kukoricáét, így a kolonizáció korábban, már kora tavasszal kialakulhatott. Az alacsony spóra produkció viszont magának a növénynek a hatását tükrözheti, hiszen a kukoricával ellentétben a búza fakultatívan mikotróf növénynek számít (PLENCHETTE et al. 2005). A legkisebb

átlagos spóraprodukciót eredményező 2 év búza/2 év kukorica vetésforgó rendszerben (CR5) is kizárólag búza váltakozik a kukoricával. A búza-kukorica rotáció hazánkban igen elterjedt, de úgy tűnik, hogy az AM gomba spóraprodukcióra negatív hatással lehet. Eredményeinktől eltérően, kukorica monokultúrák vetésforgó rendszerekkel történő összehasonlítása során OEHL et al. (2003) alacsonyabb AM gomba-spóraszámot (átlag 2,5–8,0 db g⁻¹ talaj) állapított meg a kukorica monokultúrákban, mint a hét éves időtartamú vetésforgók talajaiban (átlag 9,7–12,5 db g⁻¹ talaj). A vizsgálatot viszont márciusban, a kukorica vegetációs periódusát megelőzően végezték, és a három kukorica monokultúra mindegyike műtrágyázott volt, míg a két vetésforgó kisebb mennyiségű műtrágyát kapott szerves kiegészítéssel (istállótrágya és szennyvíziszap). A mi esetünkben sem a kukorica monokultúra, sem a vetésforgók nem részesültek tápanyag-utánpótlásban.

A gyökereket aktívan kolonizáló AM gombák azonosítása

Ahhoz, hogy a termesztési és talajhasználati eljárások AM gombákra gyakorolt hatását mélyrehatóbban tanulmányozhassuk, molekuláris technikával azonosítottuk a hosszú távú monokultúrás és különböző vetésforgó tartamkísérletekből származó növényi gyökereket aktívan kolonizáló AM gomba-közösségek tagjait, és feltártuk azok filogenetikai viszonyait.

Kukorica monokultúrájánál a kukorica növények AM gomba-közösségében a *Septoglomus* nemzetséghez tartozó *Glomus viscosum* BEG 126 AM gombafajjal filogenetikai rokonságban álló molekuláris operatív taxonómiai egység dominált. Ezzel rokon AM gombákat (*Septoglomus constrictum*) és általánosságban a korábbi *Glomus* Group Aa fajsoporthoz, vagyis a jelenlegi *Septoglomus* és *Funneliformis* nemzetségekhez tartozó AM gombafajokat korábban már detektálták domináns AM gomba-közösség alkotóként kukorica monokultúrában (BAINARD et al. 2012, OEHL et al. 2005). Azokból a rotációs rendszerekből, melyekben pillangós növény szerepelt a növényi összetételben (CR3 és CR7) ez a „filotípus” teljesen eltűnt, melyből arra következtetünk, hogy az alacsony tápanyag-ellátottságú kukorica monokultúrában annak az AM gombának, mely ezt a MOTU-t képviseli, kiemelkedő szerepe lehet a kukorica növény tápanyag-ellátásában. Ez a szerep a tápanyagszint növekedésével valószínűleg vesztit jelentőségéből, így nyújtva teret a nagy szénhidrát igényű, ruderális és generalista AM fajoknak, mint amilyen a *Rhizophagus intraradices* vagy a Glo4 filotípusú AM gomba is.

A szakirodalomban igen ellentmondásos adatokat találhatunk a vetésforgó AM gomba diverzitásra gyakorolt hatásairól. Mivel az egyazon környezeti körülmények AM gomba-közösségre kifejtett erős szelekciós hatásaira már számos esetben fény derült, így nehezen értelmezhető az a tény, hogy a monokultúrás termesztési háttérnél munkánk során több „faj” került kimutatásra. Ennek oka lehet egyrészt, hogy a terület eredetileg gazdag AM gombaközösséggel rendelkezhetett, másrészt az általunk összehasonlított termesztési rendszerek, így sem a kukorica monokultúra, sem a vetésforgó rendszerek nem részesültek tápanyag-utánpótlásban. A szakirodalomban gyakran találkozni olyan AM gomba diverzitás-vizsgálatokkal, mely során a vetésforgó rendszerek, ökológiai vagy kis ráfordítású (főleg szerves tápanyag-beviteli) gazdálkodás részeként voltak összevetve az intenzív (szervetlen tápanyag-beviteli) monokultúrás termesztési rendszerekkel (HURI et al. 2006, OEHL et al. 2003, 2009). Az általunk vizsgált termesztési rendszereknél ilyen különbségek nem befolyásolták eredményeinket, lehetőséget nyújtva, hogy a vetésforgó és a gazdanövények AM gomba-közösségre gyakorolt hatásairól pontosabb képet alkot-

hassunk. Jelen ismereteink szerint az AM gombák nem mutatnak szoros gazdaspecifitást, ellenben preferált asszociáció megfigyelhető (BEVER et al. 1996), így maga a termesztett növény is hatással van az AM gomba-közösség diverzitására és összetételére. A kukorica monokultúrában olyan AM gombák alkották a közösséget, melyek a közel 50 éve tartó monokultúras termesztéshez, magához a kukorica növényhez, vagyis egy stabil, egyazon környezeti körülményhez adaptálódtak. A vetésforgó rendszerekben ezt a stabilitást azonban a gazdanövények váltakozása bontja meg, kiszelektálva az AM gomba-közösségből a generalista fajokat. Az egyedi MOTU-k, vagy akár kukorica-specifikusnak is mondható AM gombák csak a kukorica monokultúrában voltak megtalálhatóak, míg a generalisták a vetésforgó rendszerekben és a kukorica monokultúrában egyaránt előfordultak, mely magyarázhatja, hogy a kukorica monokultúra az első helyre került a kimutatott MOTU-k tekintetében.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a TÁMOP-4.2.2.B-10/1 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” c. valamint a K101878 sz. OTKA pályázat segítségével valósult meg. Köszönet Szalai Márknak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért, az MTA Martonvásári Kutatóintézetének a mintavételi lehetőségért, valamint Dr. Berzsényi Zoltánnak és Dr. Bónis Péternek a mintavételezéseknél nyújtott segítségükért.

Irodalom

- 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.
- 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.
- BAINARD L. D., KOCH A. M., GORDON A. M., KLIRONOMOS J. N. 2012: Temporal and compositional differences of arbuscular mycorrhizal fungal communities in conventional monocropping and tree-based intercropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 172–180.
- BEVER J. D., MORTON J.B., ANTONOVICS J., SCHULTZ P. A. 1996: Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology* 84(1): 71–82.
- CARRENHO R., SILVA E.S., TRUFEM S. F. B., BONONI V. L.R. 2001: Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 262–270.
- DUMBRELL A. J., NELSON M., HELGASON T., DYTHAM C., FITTER A.H. 2010: Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4: 337–345.
- FRANK B. F. 1885: Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 3: 128–145.
- 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.
- GERDEMANN J. W., NICOLSON T. H. 1963: Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46(2): 235–244.
- 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.
- GIOVANNETTI M., MOSSE B. 1980: An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3): 489–500.
- HJURI I., SÝKOROVÁ Z., OEHL F., INEICHEN K., MÄDER P., WIEMKEN A., REDEKER D. 2006: Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15(8): 2277–2289.

- HILDEBRANDT U., REGVAR M., BOTHE H. 2007: Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68(1): 139–146.
- IANSON D. C., ALLEN M. F. (1986): The effects of soil texture on extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores from arid sites. *Mycologia* 78(2): 164–168.
- JEFWA J. M., SINCLAIR R., MAGHEMBE J. A. 2006: Diversity of glomale mycorrhizal fungi in maize/SESBANIA intercrops and maize monocrop systems in southern Malawi. *Agroforestry Systems* 67(2): 107–114.
- KOVÁCS G. M., BALÁZS T., PÉNZES ZS. 2007: Molecular study of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the cusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, *Ophioglossaceae*). *Mycorrhiza* 17(7): 597–605.
- KOVÁCS M. G. 2008: Magyarországi növények mikorrhizáltsági vizsgálatainak összefoglalása. Mit mondhatnak ezek az adatok? *Kitaibelia* 13(1): 62–73.
- LANDWEHR M., HILDEBRANDT U., TÓUTH T., BIRÓ B., BOTHE H. 2002: The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza* 12(4): 199–211.
- 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.
- MATHIMARAN N., RUH R., VULLIQUOD P., FROSSARD E., JANSÁ J. 2005: *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza* 16(1): 61–66.
- MILLER M. A., PFEIFFER W., SCHWARTZ T. 2010: Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, in: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, pp. 1–8.
- OEHL F., SIEVERDING E., INEICHEN K., MÄDER P., BOLLER T., WIEMKEN A. 2003: Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2816–2824.
- OEHL F., SIEVERDING E., INEICHEN K., MÄDER P., WIEMKEN A., BOLLER T. 2009: Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134(3–4): 257–268.
- OEHL F., SIEVERDING E., INEICHEN K., RIS E. A., BOLLER T., WIEMKEN A. 2005: Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165(1): 273–283.
- PARNISKE M. 2008: Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6: 763–775.
- PLENCHETTE C., CLERMONT-DAUPHIN C., MEYNARD J. M., FORTIN J. A. 2005: Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science* 85(1): 31–40.
- POZO M. J., AZCÓN-AGUILAR C. 2007: Unravelling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393–398.
- RENKER C., WEISSHUHN K., KELLNER H., BUSCOT F. 2006: Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza* 16(8): 525–531.
- SAITO K., SUYAMA Y., SATO S., SUGAWARA K. 2004: Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14(6): 363–373.
- 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., BIRÓ B., VÖRÖS I. 2000: Kadmium, nikkél és cink hatása az arbuszkuláris mikorrhiza gombák faji diverzitására. *Agrokémia és Talajtan* 49(3–4): 465–476.
- 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.
- 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.
- VIERHEILIG H., STEINKELLNER S., KHAOSAAD T., GARCIA-GARRIDO J. M. 2008: The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? Varma A.N. (3rd ed) *Mycorrhiza. State of the Art, Genetics and Molecular Biology, ECO-function, Biotechnology, ECO-physiology, Structure and Systematics*, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K. pp. 307–320.

STUDY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL (AM) FUNGI UNDER THE PRESSURE OF MONOCULTURE AND DIFFERENT CROP ROTATIONS IN A LONG TERM FIELD EXPERIMENT

Z. SASVÁRI, F. MAGURNO, K. POSTA

Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Plant Protection Institute, Microbiology and Environmental Toxicology Group
H-2100 Gödöllő, Páter K. utca 1., e-mail: Sasvari.Zita@mkk.szie.hu

Keywords: arbuscular mycorrhiza, crop rotation, monoculture, maize (*Zea mays* L.), biodiversity

Nowadays environmentally friendly crop production technologies more and more come to the fore, which ensure the reduction of the amount of fertilizer and pesticide while maintaining crop yield and quality. The arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, that form symbioses with the majority of terrestrial plant species including a large proportion of cultivated plants, can play a significant role in this process. Different agricultural practices, such as mechanical disturbance, chemical fertilization and pesticide application can negatively affect the AM fungal community. Therefore, the objectives of our study were to assess the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated mainly with maize (*Zea mays* L.) in a long-term monoculture-based cultivation and various crop rotation systems (3 yrs alfalfa/5 yrs corn, 2 yrs wheat/2 yrs corn, and corn/spring barley/peas/wheat [Norfolk type] crop rotation systems), established at Martonvásár by the Agricultural Research Institute of the Hungarian Research Academy of Sciences. Our investigations aimed to determine the number of AM fungal spores in 1 g of the rhizosphere soils of plants, to estimate mycorrhization percentages, to identify the mycorrhizal fungi actively colonizing the roots of plants by molecular techniques (amplifying a portion of AM fungal 18S rDNA by nested-PCR), and to reveal the phylogenetic relationships among the members of the AM fungal community.

In accord once with the literature the root colonization rates and also the AM fungal spore numbers changed with the progress of the vegetation period. In corn monoculture we found a relatively rich AMF community even after such an extreme and durable reduction of host plant diversity. Furthermore, significant differences in the composition of AMF communities were detected between the maize monocropping and the crop rotation systems.

The research was supported by the TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-011 „Development of a complex educational assistance/support system for talented students and prospective researchers at the Szent István University” project and by grants from the National Research Council (OTKA K101878).