

Charakterystyka glomalin i oddziaływania różnych systemów uprawy na ich zawartość w glebie

Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej – Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czarotoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska

Abstrakt. Glomaliny to glikoproteiny wytwarzane przez grzyby endomikoryzowe, opłaszczające agregaty glebowe i chroniące je przed rozbięciem. Glomaliny są wyjątkowo odporne na degradację, trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszczają się w wysokiej temperaturze (121°C; 250°F) w buforze cytrynianowym o odczynie neutralnym lub alkalicznym. Ich ekstrahowanie z gleby wymaga prawie godzinnej sterylizacji. Takie właściwości powodują, że glomaliny są bardzo stabilnymi związkami będącymi idealnym „płaszczem” do ochrony agregatów glebowych przed degradacją, jednak stwarzają duże trudności w poznaniu i ustaleniu ich dokładnej budowy.

Celem niniejszej pracy było wykazanie obecności glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych w glebach pochodzących z różnych systemów uprawy pszenicy ozimej.

Próbki gleb pobrano spod pszenicy ozimej odmiany Sukces (S) i odmiany Roma (R) uprawianych w trzech systemach: ekologicznym (E), integrowanym (I) i monokulturze (M) w Stacji Doświadczalnej IUNG-PIB w Osinach (woj. lubelskie). Poszczególne systemy charakteryzowały się odmiennym zmianowaniem oraz właściwymi dla danego systemu zabiegami agrotechnicznymi. W próbkach glebowych oznaczono zawartość glomalin oraz aktywność biologiczną gleb wyrażoną zarówno liczebnością drobnoustrojów glebowych, jak i aktywnością enzymatyczną.

Wykazano, iż ilość wytwarzanych przez grzyby AMF glomalin zależała m.in. od systemu uprawy gleby oraz nie korelowała z zawartością węgla ogólnego i azotu w glebie. W systemie ekologicznym produkcja glomalin i ich występowanie w glebie były znacznie większe niż w systemie integrowanym i monokulturze.

słowa kluczowe: gleba, system uprawy roślin, glomalina ogólna, glomalina łatwoekstrahowalna

WSTEP

Gleba składa się z cząstek mineralnych o różnej wielkości i kształcie oraz różnych właściwościach chemicz-

nych w mieszaninie z korzeniami roślin, żywą populacją organizmów oraz materią organiczną. Glebowa substancja organiczna odgrywa główną rolę w tworzeniu struktury gleby i z tego względu ma bardzo duży wpływ na penetrację wody, rozwój korzeni i odporność na erozję. Materia ta jest także magazynem składników pokarmowych, nadaje glebie kolor i warunkuje pojemność absorpcyjną dla kationów. Wiadomo, że nawet pojedynczy czynnik jest w stanie kontrolować produktywność gleb zarówno uprawianych, jak i nie uprawianych oraz zawartość materii organicznej w profilu glebowym.

Od niedawna do czynników wpływających na ocenę trwałości agregatów glebowych i ocenę struktury gleb zaliczono glomaliny. Odkryte po raz pierwszy we wczesnych latach 90. XX wieku w USA przez Sarę F. Wright, swoją nazwę zawdzięczają grzybom mikoryzy arbuskularnej (zwanych dalej jako AMF z ang. *arbuscular mycorrhizal fungi*) zaliczanym do rzędu *Glomales*, które tworzą arbuskule w układach symbiotycznych z roślinami. Białka te to glikoproteiny grzybowe o unikalnych właściwościach fizykochemicznych, opłaszczające agregaty glebowe i chroniące je przed rozbięciem (Wright, Upadhyaya, 1996; 1998). W krajowym piśmiennictwie naukowym jest niewiele pozycji dotyczących glomalin.

AMF wchodzi w symbiozę niemal ze wszystkimi roślinami użytkowymi rolniczo, w tym także z motylkowatymi oraz niektórymi drzewami, krzewami i trawami. Występuje ona w glebach o pH obojętnym, zawierających przyswajalny azot mineralny. Fosfor jest często składnikiem występującym w tych warunkach w ograniczonej ilości. Zewnętrzne struktury grzybów AMF to penetrujące glebę strzępki i pojedyncze spory spoczynkowe (Wright, 1994; Miller, Jastrow, 2000; Rilling i in., 2002).

Długie i cienkie strzępki grzybowe produkują wachlarzowatego kształtu kompleksy wąskich, rozgałęzionych nici zakazających korzenie roślin będących z nimi w symbiozie. To tu następuje produkcja glomalin oraz ich magazynowanie. Strzępki grzybowe mogą tworzyć nawet kilkucentymetrowej grubości otoczkę oplatając korzenie roślin

Autor do kontaktu:

Anna Gałązka

e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

tel. +48 81 8863421, faks +48 81 8864547

Praca wpłynęła do redakcji 8 lipca 2013 r.

i uzyskując w ten sposób większy dostęp do substancji odżywczych zawartych w glebie. Glomaliny wytwarzane przez grzyby AMF okrywają strzępki grzybni chroniąc wodę i składniki odżywcze przed utratą w drodze do i z rośliny. Uważa się, że na zasadzie transportu wymiennego, w momencie pobierania wody i składników odżywczych przez strzępki grzybowe, glomaliny zostają „wyrzucone” na zewnątrz, gdzie opłaszczają cząstki glebowe, łącząc je ze sobą i tym samym utrzymując trwałość agregatów glebowych chroniąc je przed rozpadem (Wright, Upadhyaya, 1996; 1998; 1999).

Pobieranie z gleby składników pokarmowych, głównie fosforu, i ich translokacja to jedna z podstawowych korzyści dla roślin funkcji grzybów AMF obok produkcji glomaliny. Grzyby AMF mają możliwość penetrowania zwiększonej objętości gleby. Rośliny zainfekowane grzybami AMF są zdolne do pobierania fosforu z roztworów o niższej koncentracji niż rośliny nie zainfekowane. Sądzi się, że rośliny mikoryzowe są bardziej odporne na suszę, ponadto roślina jest chroniona przed patogenami, nicieniami i dużym stężeniem metali ciężkich w strefie korzeni. Grzyby dostają w zamian od rośliny rozpuszczalny węgiel. Konwersja węgla roślinnego w grzybach AMF do związków glikolipidowych stanowi mechanizm akumulacji substancji pokarmowych przez grzyby (Rilling i in., 2002).

Glomaliny występują powszechnie we wszystkich glebach na całym świecie. Produkowane są przeważnie w dużych ilościach, chociaż znane są przykłady gleb, gdzie glomaliny występują w bardzo małych stężeniach. Gleby lasów tropikalnych, ze względu na wysoką temperaturę i dużą wilgotność, charakteryzują się niskim stężeniem glomaliny 0,7–1,5 mg·g⁻¹ w przeciwieństwie do gleb z klimatu umiarkowanego i podzwrotnikowego, gdzie zaznacza się wysokie stężenie glomaliny nawet do 100 mg·g⁻¹ gleby, co tłumaczy się szybkimi zmianami klimatu, wysokim stężeniem żelaza w glebie oraz wysokim poziomem dwutlenku węgla w atmosferze stymulującym wzrost grzybów AMF (Wright i in., 1998; Lovelock i in., 2004).

Glomaliny to białka unikalne pod względem swoich właściwości fizykochemicznych. Są wyjątkowo odporne na degradację (obecne w glebie nawet od 10 do 30 lat), są trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszczają się w wysokiej temperaturze (121°C; 250°F) w buforze cytrynianowym o odczynie neutralnym lub alkalicznym. Ich ekstrahowanie z gleby wymaga, nietypowej jak dla białek, prawie godzinnej sterylizacji (Wright, Upadhyaya 1996, 1998).

Z jednej strony takie właściwości powodują, że glomaliny są bardzo stabilnymi związkami będącymi idealnym płaszczem do ochrony agregatów glebowych przed degradacją, z drugiej zaś strony stwarzają duże trudności w poznaniu i ustaleniu dokładnej budowy tych cząsteczek.

Do tej pory nie udało się ustalić dokładnej budowy molekularnej tych białek. Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań wiadomo, że są to silnie hydrofobowe gliko-

proteiny z N-końcowym łańcuchem oligosacharydowym. To właśnie hydrofobowe domeny molekuly są odpowiedzialne za trudności w ich ekstrakcji i małą rozpuszczalność. W swojej budowie, oprócz podjednostek białkowej i cukrowej, glomaliny zawierają także żelazo. Badania Wright i Upadhyaya (2000) wykazały, iż glomaliny zawierają od 1 do 9% żelaza w cząsteczce. Wyniki szeregu technik pomiarowych wykazały odmienną budowę strukturalną glomaliny niż kwasu huminowego czy fulwowego oraz inny rozkład podjednostek białkowych i cukrowych w porównaniu do znanych już molekuł stanowiących glebową frakcję organiczną. Ponadto badania Wright (2000) wykazały, że ciężar właściwy glomaliny jest od 2 do 24 razy większy niż kwasu huminowego, przy czym wiadomo, że kwas ten stanowi zaledwie 8% zawartości węgla w glebie.

Analizy przy użyciu metody ELISA i przeciwciał monoklonalnych wykazały immunoreaktywny materiał (glomaliny) we wnętrzu strzępek grzyba, dzięki czemu możliwe stało się wykazanie sposobu rozmieszczenia i transportu glomaliny do gleby. Aktywnie rosnące strzępki wszystkich badanych grzybów AMF produkują glomaliny z wysoką immunoreaktywnością (Wright i in., 1987; Wright, 1994). Natomiast dobrze rozwinięta zewnętrzna grzybnia ma duży wpływ na agregację gleby oraz poprawę jej struktury.

Sposoby użytkowania zmieniają właściwości gleby, w różny sposób oddziałując na poszczególne gatunki roślin, charakterystykę ich ukorzenienia, zawartość wody w glebie, temperaturę, pH czy zawartość węgla organicznego lub azotu (Kuś, Jończyk, 2008).

Celem niniejszej pracy jest ocena występowania glomaliny w glebach pochodzących z różnych systemów uprawy pszenicy ozimej. Badania przedstawiono w formie krótkiego zarysu dotychczasowych osiągnięć na temat charakterystyki glomaliny na tle literatury światowej dotyczącej tego zagadnienia.

MATERIAŁY I METODY

Pobranie próbek glebowych

Badania przeprowadzono w oparciu o wieloletnie doświadczenie polowe z różnymi systemami produkcji założone w 1994 roku w RZD IUNG-PIB Kępa-Osiny (Kuś, Jończyk, 2008). Badania obejmowały pola spod pszenicy ozimej odmiany Sukces i Roma uprawianej w następujących systemach produkcji: ekologicznym (E), integrowanym (I) i monokulturze (M). Poszczególne systemy charakteryzowały się odmiennym zmianowaniem oraz właściwymi dla danego systemu zabiegami agrotechnicznymi (Kuś, Jończyk, 2008). Próbkę glebową pobrano jednorazowo (metoda kompletnej randomizacji) z głębokości 0–15 cm. Glebę suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej, a następnie przesiewano na sicie o średnicy oczek 2 mm. Próbkę glebową przechowywano w zamkniętych woreczkach foliowych w temperaturze pokojowej aż do

oznaczeń. W badanych próbkach oznaczono aktywność biologiczną gleb oraz zawartość glomalin. Oznaczono ogólną liczebność bakterii i promieniowców (Wallace, Lockhead, 1950), ogólną liczebność grzybów (Martin, 1950) oraz ogólną liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter* (Fenglerowa, 1965). Wykonano także oznaczenia aktywności enzymów glebowych: dehydrogenaz (Caside i in., 1964), fosfatazy zasadowej i kwaśnej (Tabatabai, Bremner, 1969). Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 7,0.

Ekstrakcja i oznaczenie stężenia glomalin

Z badanych próbek glebowych wyekstrahowano glomalinę oznaczając ich ilość ogólną i frakcje glomalin łatwoekstrahowalnych.

Łatwoekstrahowalne frakcje glomalin (EEG – *easily extractable glomalin*) z gleby ekstrahowano 20 mM buforem cytrynianowym pH 7,0 przez 30 minut przy 121°C, natomiast ogólną ilość glomalin (TG – *total glomalin*) 50 mM buforem cytrynianowym pH 8,0 przez 60 minut przy 121°C, według metody opisanej przez Wright i Upadhyaya (1996, 1998).

Ekstrakcję przeprowadzano kilkukrotnie, uzupełniając za każdym razem bufor cytrynianowy, aż do całkowitego wymycia gleby z frakcji organicznej. Otrzymane supernatanty po ekstrakcji zlewano razem i przechowywano w temperaturze +4°C do dalszych analiz.

W otrzymanych ekstraktach oznaczono stężenie białka metodą Bradforda (1976), polegającą na kolorymetrycznym oznaczaniu ogólnego stężenia białka przy użyciu albuminy wołowej jako standardu, z uwzględnieniem modyfikacji metody (Wright, 1999). Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali 590 nm.

W próbkach glebowych oznaczono również ogólną zawartość węgla i azotu. Całkowitą zawartość węgla w glebie oznaczono według metody Tiurina (PB 20.1 Wyd. I – 20.05.1999), natomiast zawartość azotu ogólnego metodą spektrometrii przepływowej, z użyciem mineralizacji prób na drodze mokrej (PB 16.3 Wyd. I – 14.10.2002).

WYNIKI I DYSKUSJA

W badanych próbkach glebowych oznaczono aktywność biologiczną gleb na podstawie ogólnej liczebności bakterii, promieniowców, grzybów i bakterii *Azotobacter* oraz aktywności enzymów glebowych (dehydrogenaz, fosfatazy zasadowej i kwaśnej) (tab. 1). Najwyższą aktywność biologiczną gleb stwierdzono w systemie ekologicznym oraz w monokulturze pod pszenicą odmiany Roma.

We wszystkich badanych glebach pochodzących z różnych systemów uprawy wykazano obecność glomalin i ich frakcji łatwoekstrahowalnych (tab. 2). Przy użyciu metody ekstrakcji ogólnych glomalin otrzymano znacznie wyższe stężenia ekstrahowanych białek w porównaniu do ekstrakcji łatwoekstrahowalnych glomalin.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy zawartością węgla i azotu ogólnego w próbkach glebowych a stężeniem glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych (tab. 3).

Najwyższe stężenie glomalin ogólnych wykazano w glebie pochodzącej z ekologicznego systemu uprawy pszenicy odmiany Roma, ponad 35,2 mg·g⁻¹ s.m. gleby. Znacznie mniejsze stężenia odnotowano w uprawie tej samej odmiany w monokulturze, bo jedynie około 17,45 mg·g⁻¹ s.m. gleby. W integrowanym systemie uprawy gleby wykazano znacznie mniejsze stężenia glomalin. W uprawie pszenicy odmiany Sukces w systemie integrowanym stwierdzono

Tabela 1. Aktywność biologiczna gleb
Table 1. The biological activity of soil.

Próbka Sample	pH	Ogólna liczebność [jtk·g ⁻¹ s.m. gleby] Total number of [cfu g ⁻¹ soil DM]				Dehydrogenaza [μg TPF · ml ⁻¹ · g ⁻¹ s.m. gleby] Dehydrogenase [μg TPF ml ⁻¹ g ⁻¹ soil DM]	Fosfataza kwaśna [μg PNP · ml ⁻¹ · g ⁻¹ s.m. gleby] Acid phosphatase [μg PNP ml ⁻¹ g ⁻¹ soil DM]	Fosfataza zasadowa [μg PNP · ml ⁻¹ · g ⁻¹ s.m. gleby] Alkaline phosphatase [μg PNP ml ⁻¹ g ⁻¹ soil DM]
		bakterii; bacteria [10 ⁸]	promieniowców <i>Actinomycetes</i> [10 ⁸]	grzybów <i>Fungi</i> [10 ⁴]	<i>Azotobacter</i> [10 ¹]			
RE	6,6	98 a	142 a	25 a	2,34 a	56,25 a	28,35 a	33,25 a
RM	5,1	75 a	132 a	18 b	0	42,32 a	21,54 a	28,56 a
RI	5,6	35 c	87 b	5 c	0	12,53 b	8,72 c	10,82 a
SE	6,1	78 b	120 a	36 a	2,7 a	87,25 a	32,4 a	41,2 a
SM	6,0	88 b	110 a	31 a	1 b	52,4 a	36,8 a	38,9 a
SI	6,0	42 c	18 c	8 c	0	21,23 b	14,12 b	15,21 a

R – odmiana pszenicy Roma, winter wheat Roma cultivar; S – odmiana pszenicy Sukces; winter wheat Sukces cultivar

E – system ekologiczny, organic system; M – monokultura, monoculture; I – system integrowany, intergated system

wartości średnie dla n=5; mean values for n=5

Wartości oznaczone literami a, b, c różnią się między sobą istotnie statystycznie (p<0,05); Values signed with different letters are significantly differ.

Tabela 2. Ekstrakcja glomalin ogólnych (TG) i łatwoekstrahowalnych (EEG)

Table 2. Extraction of total glomalin and easily extractable glomalin.

Odmiana i system uprawy Cultivar and system	TG [mg·g ⁻¹]	EEG [mg·g ⁻¹]	%C	%N
RE	35,2 a	20,3 a	1,04 a	0,084 a
RM	17,45 b	13,87 b	0,85 a	0,068 b
RI	16,02 b	13,10 b	0,65 b	0,062 b
SE	31,5 a	25,3 a	1,1 a	0,075 a
SM	22,8 a	15,7 b	0,98 a	0,068 b
SI	14,51 b	13,67 b	0,74 b	0,055 b

wartości średnie dla n=5; mean values for n=5

wartości oznaczone literami a, b, c różnią się między sobą istotnie statystycznie (p<0,05); values signed with different letters are significantly differ

R, S, E, M, I – patrz tab. 1; see Table 1

Tabela 3. Wartości współczynnika korelacji prostej Pearsona (p<0,05).

Table 3. Values of coefficient simple correlation of Pearson.

Odmiana i system uprawy Cultivar and system	%C	%N	%C	%N
	TG [mg·g ⁻¹]	EEG [mg·g ⁻¹]		
RE	0,125	0,025	0,058	0,125
RM	0,025	0,058	0,258	0,185
RI	0,231	0,142	0,178	0,310
SE	0,321	0,215	0,278	0,078
SM	0,215	0,187	0,189	0,187
SI	0,214	0,028	0,258	0,361

R, S, E, M, I – patrz tab. 1; see Table 1

mnijšie stężenia glomalin, bo około 14,51 mg·g⁻¹ s.m. gleby w porównaniu do odmiany Roma – 16,02 mg·g⁻¹ s.m. gleby uprawianej w tym samym systemie (tab. 2).

Wyniki metody ekstrakcji łatwoekstrahowalnych glomalin przedstawiają podobną zależność między stężeniem glomalin a systemem uprawy. Najwyższe stężenie glomalin otrzymano w systemie ekologicznej uprawy pszenicy Roma – około 20,3 mg·g⁻¹ s.m. gleby. W systemie integrowanym uprawy pszenicy Roma stwierdzono niewiele niższe stężenie glomalin około 13,1 mg·g⁻¹ s.m. gleby w porównaniu do odmiany Sukces około 13,67 mg·g⁻¹ s.m. gleby uprawianej w tym samym systemie. Podobne stężenie glomalin wykazano w systemie monokulturowej uprawy pszenicy odmiany Roma 13,87 mg·g⁻¹ s.m. gleby (tab. 2).

Najwyższe wartości glomalin wykazane w systemie ekologicznym można tłumaczyć m.in. tym, iż grzyby

AMF, produkujące glomaliny, wymagają do prawidłowego rozwoju i wzrostu gleby o odczynie bliskim neutralnego oraz zawierającej odpowiednią ilość przyswajalnego azotu mineralnego. System ekologiczny jako jedyny wśród badanych charakteryzował się odczynem gleby o pH około 6,6 i tylko w tym systemie wykazano obecność wiążącej azot, wolnożyjącej bakterii z rodzaju *Azotobacter*.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdziły dwa założenia Wright i Upadhyaya (1996, 1998): (i) glomaliny, glikoproteiny produkowane przez grzyby AMF są obecne we również w badanych glebach; (ii) występują one w glebie w dużych ilościach.

Już wcześniej Haynes i Swift (1990) prowadzili badania nad obecnością i udziałem węglowodanów w tworzeniu agregatów glebowych, a Gijsman i Thomas (1995) wykazali pozytywne korelacje pomiędzy trwałością agregatów glebowych a ilością węglowodanów ekstrahowanych z gleby. Analiza chemiczna frakcji organicznej wykazała, że znajdująca się w mikroagregatach substancja organiczna jest głównie pochodzenia mikrobiologicznego, zaś w agregatach glebowych jest większa zawartość składników pokarmowych niż w glebie poza nimi (Oades, 1984; Rilling i in., 1999, 2001). Badania te stały się podstawą do dalszych analiz zawartości C, H i N w agregatach glebowych, co przyczyniło się do odkrycia glomalin (Wright, 1996; Buier i in., 2011).

Glomaliny zawarte w glebie mają kolor brązowy, po dokładnej kilkukrotnej ekstrakcji wymyta gleba uzyskuje szary kolor spowodowany przejściem organicznej frakcji do ekstraktu i pozostaniu w glebie jedynie frakcji mineralnej. Uważa się, że czerwonobrązowa barwa otrzymanego ekstraktu związana jest z zawartością żelaza w cząsteczce glomalin. Duża ilość żelaza w glomalinach chroni rośliny przed patogenami (Wright i in., 1994, 1996).

Udowodniono, że grzyby AMF chronią uprawiane rośliny przed takimi patogenami, jak *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, a także przed atakiem nicieni. Mechanizm obrony polega na tworzeniu bariery fizycznej i produkcji antybiotyków. Należy również poświęcić więcej uwagi badaniom nad przyczynami zachowania się grzybów AM jak pasożytów.

Badania Nichols (2004) udowodniły, że glomaliny zawierają około 27% węgla obecnego w glebie i są głównym składnikiem glebowej substancji organicznej (Nichols, 2004). Dodatkowe badania wykazały, że glomaliny stanowią około 2% ogólnej masy agregatów glebowych (Wright, Upadhyaya, 1999). Wiadomo, że nierozpuszczalne, silnie hydrofobowe glomaliny opłaszczają cząstki glebowe przyczyniając się do trwałego łączenia agregatów glebowych, a tym samym do poprawy struktury gleby oraz ochrony minerałów zawartych w mikro- i makroagregatach glebowych, mikroorganizmów i frakcji organicznej gleby przed degradacją i erozją wodną oraz powietrzną (Wright, Anderson, 2000). Grzyby AMF w efekcie swojej działalności mogą powodować agregację gleby, szczegól-

nie wytworzonej z piasku gruboziarnistego, stabilizację wydm piaszczystych i materiału pokopalnianego. Ich rola w agregacji, a tym samym zwiększeniu penetracji wody, ochronie glebowej materii organicznej przed rozkładem, wzroście odporności gleb na erozję, wydaje się tak samo ważna, a może nawet ważniejsza niż ich rola w absorpcji składników pokarmowych. Stwierdzono, że istnieje bardzo ścisła zależność pomiędzy długością strzępek grzybów w glebie a ilością w niej agregatów wodoodpornych.

Ponadto silnie hydrofobowy, polisacharydowy łańcuch glomaliny ma także zdolność wyłapywania i przyłączania do siebie drobnych cząstek glebowych, a nawet mikroorganizmów. W ten sposób dobrze zagregowana struktura gleby utrzymuje odpowiednie przewietrzenie, wilgotność oraz odpowiedni skład komponentów niezbędnych do optymalnego wzrostu uprawianych roślin (Wright i in. 1999; Comis, 2003; Bedini i in., 2010).

W warunkach gleb suchych dyfuzja fosforu jest od 10 do 100 razy wolniejsza niż w glebach wilgotnych. Translokacja P wewnątrz grzybów AMF odbywa się poprzez ruch cytoplazmy, głównie w postaci polifosforanów. Uważa się, że taką samą drogą przebiegają glomaliny wewnątrz cytoplazmy w komórkach strzępek grzybowych. Grzyby AMF pobierają także Zn i Cu i w warunkach deficytu tych pierwiastków znacznie podnoszą plony (Rilling, 2001).

Badania nad ochroną roślin *Vicia faba* zainfekowanych AMF rosnących na glebie o wysokiej zawartości Mn dowiodły, że mikoryza skutecznie chroniła je przed toksycznym działaniem manganu (Rilling, 2001). Metale ciężkie wiązane są przez grupy karboksylowe związków pektynowych (hemielulozy) wypełniających przestrzeń pomiędzy grzybem a komórką roślinną. Przypuszcza się, że w proces ten zaangażowane są także glomaliny. Pobieranie związków z grupy triazyn i innych herbicydów przez wrażliwe rośliny uprawne staje się poważnym problemem w wielu systemach płodozmianowych. Dużo faktów wskazuje, że zwiększona pojemność absorpcyjna AMF może ułatwiać ten proces i zastrzyć problem wrażliwości na herbicydy.

Stwierdzono dużą naturalną różnorodność grzybów AMF. To zróżnicowanie, które może być zwiększone metodami genetyki molekularnej, wskazuje na szansę polepszenia zaopatrzenia roślin w składniki pokarmowe na drodze biologicznej. Do najczęściej spotykanych grzybów AM zaliczamy: *Glomus mosseae* (zakażający m.in. *Vicia faba* i *Allium porrum*) i *Glomus fasciculatum* (zakażający soję *Glycine max*).

Po zastosowaniu tradycyjnej uprawy następuje stymulacja aktywności mikrobiologicznej gleby, którą można wykazać na podstawie zwiększonej liczebności mikroorganizmów i wyższego tempa oddychania (Myśków, 1981; Martyniuk, 1997; Dopka i in. 2013). Taka stymulacja jest rezultatem rozbicia agregatów glebowych, a więc wyeksponowania i natlenienia obecnych w nich substancji podatnych na degradację. Przeciwnie, użytkowanie bez zabie-

gów uprawowych wzmacnia aktywność mikrobiologiczną przy lub w pobliżu powierzchni gleby. Ponadto zabiegi uprawowe, jak również monokultury nie sprzyjają rozwojowi mezo- i makrofauny oraz grzybów mikoryzowych. Uprawa rozrywa makroagregaty, a w nich stwierdza się najwyższe tempo mineralizacji (Koper i in., 2003; Stanisławska-Glubiak, Korzeniowska, 2011).

Stwierdzono korzystny wpływ grzybów AMF na wiązanie azotu przez rośliny m.in. motylkowate (stąd obecność *Azotobacteria* w glebie uprawianej w systemie ekologicznym). Sądzi się, że jest to pośredni efekt poprawy żywienia roślin, czyli gospodarza AMF (Miller, Jastrow, 1992). Z drugiej jednak strony udowodniono, że poziom wiązania N₂ jest różny w warunkach polowych, co może być częściowo spowodowane konkurencją o węgiel roślinny z grzybem AMF. Wykazano, że wiązanie N₂ obniża się w roślinach zainfekowanych przez grzyby AMF i bardzo silnie zależy od biovaru rośliny (Wright, 1994). Obecność *Azotobacteria* w glebie pochodzącej z systemu ekologicznego nie potwierdza jednak tych doniesień. *Azotobacter* jako diazotrof rosnący w ryzosferze przylega bezpośrednio do korzenia i penetruje jego warstwę korową. Diazotrofy syntetyzują także hormony wzrostu, które wpływają na rozwój korzenia. Stąd też możliwy różny poziom wiązania N₂ w glebie zakażonej grzybem AMF.

Uprawie roślin w monokulturze towarzyszy zwykle spadek żyzności i produktywności gleby, a tym samym plonowania roślin. Przyczyną tego zjawiska jest „zmęczenie gleby” spowodowane toksycznym działaniem substancji biologicznie czynnych i ich metabolitów oraz nagromadzeniem grzybów patogennych, eliminujących grzyby mikoryzowe (Krogulec i in., 1980). Badania przeprowadzone w Minnesocie (Wright, 2000, 2007b) sugerują, że uprawa roślin w monokulturze selekcjonuje grzyby AMF w kierunku gorszych symbiontów, gdyż w wielu przypadkach stwierdza się obniżkę plonu przy kontynuowaniu uprawy w monokulturze. Stwierdzono, że rezultatem zmianowania jest różnorodność typów AMF oraz wyższe plony zarówno kukurydzy, jak i soi oraz wyższa w nich zawartość składników pokarmowych.

Rolnictwo ekologiczne dzięki wykluczeniu pestycydów i nawozów sztucznych nie powoduje zanieczyszczenia gleby i wód gruntowych ksenobiotykami, ogranicza wymywanie składników pokarmowych z gleby oraz sprzyja rozwojowi mikroorganizmów glebowych (Koper i in., 2003; Tujaka, Terelak, 2012; Święcicki i in., 2011). Dzięki temu, że system ekologicznej uprawy jest oparty na budowaniu biologicznej równowagi między wszystkimi komponentami ekosystemów polowych i sąsiadujących z nimi zamiast dominacji wybranych elementów osiągniętych za pomocą przepływowości środków produkcji (nawożenie mineralne, środki ochrony roślin), jest on najlepszym systemem wśród badanych do rozwoju grzybów AM i produkcji przez nie glomaliny. Całokształt agrotechniki

powinien bowiem umożliwić uzyskanie korzystnego stanu sanitarnego gleby i ograniczać w ten sposób nasilenie chorób i szkodników, jak również zapobiegać nasilonemu występowaniu agrofagów (Kuś, 1996).

Udowodniono oddziaływanie systemu uprawy na agregację gleby i długość strzępek AM (Wright, Anderson, 2000). Integrowany system uprawy charakteryzujący się kombinacją różnych zabiegów agrotechnicznych może zakłócać rozwój grzybów AM, a tym samym obniżyć produkcję przez nie glomalin, czego efektem jest niższy poziom tego białka w glebie w stosunku do systemu ekologicznego. Orka rozrywa strzępki grzybowe, co znacznie opóźnia infekcję roślin przez AMF. Zmniejszenie kolonizacji prowadzi do mniejszego pobierania fosforu i niższego plonu roślin w stosunku do uprawianych w systemie bezorkowym. Stąd też kontynuowanie uprawy w monokulturze, jako przykładzie skrajnie uproszczonego systemu konwencjonalnego, powoduje obniżkę plonu. Natomiast rezultatem zmianowania jest zarówno różnorodność typów AMF, jak i wyższe plony uprawianych roślin (Wright, Upadhyaya, 1998). Wiadomo bowiem, że system produkcji poprzez zmianę właściwości gleb wpływa na plonowanie i jakość uprawianych roślin.

Grzyby mikoryzowe aktywnie rozwijają się w systemie głównie bezorkowym i mogą powodować: agregację gleby, zwiększenie penetracji wody, ochronę materii organicznej przed rozkładem oraz wzrost odporności gleb na erozję (Miller, Jastrow, 1992, 2000). Stąd też wysokie stężenie glomalin zaznacza się głównie w niezakłóconym, bezuprawowym systemie, co jest wynikiem formowania oraz utrzymywania trwałości agregatów glebowych. W konwencjonalnym systemie uprawy gleby, gdzie następuje rozbieżność agregatów glebowych oraz inwazyjne rozerwanie filamentów grzybowych, zawartość glomalin w glebie jest niska (Wright i in., 1999, 2006, 2007a).

Wyniki oznaczenia ogólnego stężenia glomalin mogą być mylące, gdyż w stosowanej metodzie ekstrahowana jest również ekstremalnie odporna na niekorzystne warunki część frakcji organicznej gleby, niekoniecznie same glomaliny (Tisdall, Oades, 1982; Mirás-Avalos i in., 2011). Bardziej wiarygodne w ocenie trwałości agregatów glebowych stają się więc EEG, których wartości mogą odzwierciedlać rzeczywistą zawartość glomalin w glebie (Wright, Upadhyaya, 1996). Tłumaczyć to można także tym, iż, jak wykazały wcześniejsze badania, glomaliny ogólne charakteryzuje znacznie mniejsza immunoreaktywność w porównaniu do łatwoekstrahowalnych glomalin wykazujących wyższą immunoreaktywność w przeprowadzonych testach immunochemicznych z użyciem przeciwciał monoklonalnych (Wright, Upadhyaya, 1999).

Ponadto wysokie wartości stężeń EEG i związana z tym trwałość agregatów glebowych wskazuje, że łatwoekstrahowalne frakcje glomalin mogą w jednoznaczny sposób tłumaczyć związek pomiędzy trwałością agregatów glebowych a praktykami rolniczymi (Wright i in., 1998;

Gillespie i in., 2011), a tym samym stać się czynnikiem charakteryzującym strukturę gleby poprzez ocenę trwałości agregatów glebowych.

Gleby użyte w tym doświadczeniu pochodziły z jednego geograficznie miejsca, dlatego pominięto różnice pomiędzy wpływem klimatu a składem komponentów glebowych oraz budową strukturalną, przyjmując ją za taką samą dla wszystkich próbek. Stąd też, stężenie otrzymanych glomalin w poszczególnych systemach uprawy odzwierciedla jedynie wpływ danej odmiany i systemu na rozwój grzybów AMF i produkcję przez nie glomalin, a tym samym trwałość agregatów glebowych.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że glomaliny, glikoproteiny produkowane przez grzyby mikoryzy arbuskularnej, są obecne również w glebach polskich w dość wysokich stężeniach. Ilość wytwarzanych przez grzyby AM glomalin zależy m.in. od systemu uprawy. System ekologiczny znacznie podwyższał produkcję glomalin i ich koncentrację w glebie w przeciwieństwie do integrowanego systemu uprawy i monokultury.

WNIOSKI

1. W badanych próbkach glebowych stwierdzono zawartość zarówno glomalin TG jak i EEG.
2. Brak korelacji pomiędzy zawartością węgla i azotu ogólnego w próbkach glebowych a stężeniem glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych sugeruje, iż glomaliny stanowią odrębną grupę związków węgla w glebie.
3. Wysokie zawartości glomalin TG i EEG w próbkach glebowych potwierdzają przyjętą hipotezę, iż białka te występują powszechnie w badanych polskich glebach spod trzech systemów produkcji.

PIŚMIENNICTWO

- Bedini S., Turrini A., Rigo Ch., Argese E., Giovannetti M., 2010.** Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biol. Biochem.*, 42: 758-765.
- Bradford M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Buyer J.S., Zuberer D.A., Nichols K.A., Franzluebbers A.J., 2011.** Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant Soil*, 339: 401-412.
- Dopka D., Korsak-Adamowicz M., Starczewski J., 2013.** Zmiany właściwości fizycznych gleby w monokulturowej uprawie żyta jarego. *Polish J. Agron.*, 12: 3-8.
- Gillespie A.W., Farrell R.E., Walley F.L., Ross A.R.S., Leinweber P., Eckhardt K.-U., Regier T.Z., Blyth R.I.R., 2011.** Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol. Biochem.*, 43: 766-777.

- Haynes R.I., Swift R.S., 1990.** Stability of soil aggregate in relation to organic constituents and soil water content. *J. Soil Sci.*, 41: 73-83.
- Koper J., Maniewska R., Piotrowska A., Kaszewska J., 2003.** Następce oddziaływanie zmianowania tradycyjnego i monokultury na stan fitosanitarny gleby i jej strukturę. *Zesz. Nauk ATR Bydgoszcz, Rolnictwo*, 492: 155-160.
- Krogulec T., Kuczyńska L., Niklewska T., Busko J., 1980.** Wpływ monokultury na mikroorganizmy glebowe. *Zesz. Nauk ART Olsztyn, Rolnictwo*, 29: 57-65.
- Kuś J., 1998.** Wstępne porównanie trzech systemów gospodarowania: konwencjonalnego, integrowanego i ekologicznego. *Rocz. AR Poznań*, 307(52): 119-126.
- Kuś J., Jończyk K., 2008.** Wpływ ekologicznego i konwencjonalnego sposobu gospodarowania na wybrane parametry żywności gleby. *J. Res. Appl. Agric.*, 53(3): 161-165.
- Lovelock C.E., Wright S.F., Nichols K.A., 2004.** Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1009-1012.
- Martyniuk S., Stachyra A., Gajda A., 2002.** Microbiological and biochemical properties of soil under cereals grown in the ecological, conventional and integrated system. *Acta Agrophys.*, 52: 185-192.
- Myśków W., 1981.** Próby wykorzystania wskaźników aktywności mikrobiologicznej do oceny stanu żyzności gleb. *Post. Mikrobiol.*, 20: 173-192.
- Miller R.M., Jastrow J.D., 1992.** The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. *American Society of Agronomy, Madison, WI, USA Mycorrhizae Sustain. Agric.*, 54: 29-43.
- Miller R.M., Jastrow J.D., 2000.** Mycorrhizal fungi influence soil structure. *Molecul. Biol. Physiol.*, 40: 3-18.
- Mirás-Avalos J.M., Antunes P.M., Koch A., Khosla K., Klironomos J.N., Dunfield K.E., 2011.** The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia*, 54: 235-241.
- Nichols K.A., 2004.** Characterization of glomalin a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Agric. Soil Sci.*, 81: 123-129.
- Oades J.M., 1984.** Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant Soil*, 76: 319-337.
- PB 20.1 Wyd. I – 20.05.1999 – metodyka oznaczeń całkowitej zawartości węgla w glebie metodą Tiurina.
- PB 16.3 Wyd. I – 14.10.2002 – metodyka oznaczeń zawartości azotu ogólnego metodą spektrometrii przepływowej z użyciem mineralizacji prób.
- Rilling M.C., Wright S.F., Allen M.F., Field C.A., 1999.** Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, 400: 625-628.
- Rilling M.C., Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F., Torn M.S., 2001.** Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, 233: 167-177.
- Rilling M.C., Steinberg P.D., 2002.** Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol. Biochem.*, 34: 1371-1374.
- Schindler F.V., Mercer E.J., Rice J.A., 2007.** Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 320-329.
- Stanisławska-Głubiak E., Korzeniowska J., 2011.** Impact of zero tillage system on the nutrient content of grain and vegetative parts of cereals. *Polish J. Agron.*, 4: 29-32.
- Święcicki W.K., Surma M., Koziara W., Skrzypczak G., Szukała J., Bartkowiak-Broda I., Zimny J., Banaszak Z., Marciniak K., 2011.** Nowoczesne technologie w produkcji roślinnej – przyjazne dla człowieka i środowiska. *Polish J. Agron.*, 7: 102-112.
- Tisdall J.M., Oades J.M., 1982.** Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.*, 33: 141-163.
- Tujaka A., Terelak H., 2012.** The balance of phosphorus in the agriculture of Poland. *Polish J. Agron.*, 9: 29-33.
- Wright S.F., 1994.** Serology and conjugation antibodies. *Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties Part 2: Soil Science Society of America, Madison, WI, USA*, ss. 593-618.
- Wright S.F., Anderson R.L., 2000.** Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biol. Fertil. Soils*, 31: 249-253.
- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., Upadhyaya A., 1996.** Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil*, 181: 193-203.
- Wright S.F., Green V.S., Cavigelli M.A., 2007.** Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil Till. Res.*, 94: 546-549.
- Wright S.F., Morton J.B., Sworobuk J.E., 1987.** Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2222-2225.
- Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F., 2006.** Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere*, 64: 1219-1224.
- Wright S.F., Starr J.L., Paltineanu I.C., 1999.** Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Sci. America J.*, 63: 1825-1829.
- Wright S.F., Upadhyaya A., 1996.** Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.*, 161: 575-586.
- Wright S.F., Upadhyaya A., 1998.** Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soil by capillary electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1853-1857.
- Wright S.F., Upadhyaya A., 1999.** Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, 8: 283-285.

A. Gałązka

CHARACTERISTICS OF GLOMALIN AND IMPACT OF DIFFERENT TILLAGE SYSTEMS ON THEIR CONTENT IN THE SOIL

Summary

Glomalins are glycoproteins produced by endomycorrhizae fungi which surround soil aggregates and protect them from being destroyed. Glomalins are especially resistant to destruction,

hard to dissolve in water, while very easily soluble at high temperature (121°C; 250°F) in citrate buffer with neutral or alkali pH. Their extraction from the soil requires almost one hour of sterilization. These properties make glomalins very stable compounds that provide a perfect “jacket” for protection of soil aggregates against degradation, however they are also difficult to understand and to determine the structure thereof.

The aim of the study was to demonstrate the presence of total and easily extractable glomalins in soils from different tillage systems of winter wheat.

Soil samples were taken from winter wheat fields, variety Sukces (S) and variety Roma (R) in three different tillage systems: organic (E), integrated (I) and monoculture (M) in Experimental Station of IUNG-PIB in Osiny (lubelskie voivodship).

Individual systems involved different crop rotations and different agricultural treatments appropriate for a given system. The soil samples were examined for total content of glomalins and for their biological activity, expressed as total number of soil microorganisms and enzymatic activity.

It was demonstrated, that the amount of glomalins produced by endomycorrhizae fungi, depended on the tillage system and was not correlated with total carbon and nitrogen in soil. In organic system of tillage, the production and content of glomalins were significantly higher than in integrated and monoculture systems.

key words: soil, tillage systems, total glomalin, easy extractable glomalin