

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy



RAPORT KOŃCOWY
z tematu badawczego Nr 1.16.

**Ocena jakości środowiska glebowego poprzez określenie
zawartości glomalin**

zrealizowanego w ramach działalności statutowej
w podprogramie badawczym Nr 1.

Koordynator podprogramu badawczego:
prof. dr hab. Teresa Doroszevska

Kierownik tematu:
dr Anna Gałązka

Zespół badawczy tematu:
prof. dr hab. Stefan Martyniuk
dr Anna Gałązka
dr Andrzej Księżniak
dr Grzegorz Siebielec
mgr Karolina Gawryjolek
mgr Sylwia Siebielec

Zakłady Naukowe realizujące temat:
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów

Okres realizacji tematu: styczeń 2015 – grudzień 2017.

Puławy, 2017 r.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	3
1.1. Arbuskularne grzyby mykoryzowe.....	3
1.2. Budowa i właściwości glomalin.....	6
1.3. Produkcja i rozkład glomalin.....	7
1.4. Występowanie glomalin.....	11
1.5. Terminologia i metodyka oznaczeń glomalin	12
1.6. Funkcje glomalin.....	15
1.7. Czynniki wpływające na spadek produkcji glomalin.....	16
2. MATERIAŁY I METODY	17
2.1. Materiał glebowy.....	17
2.2. Oznaczenia stężenia glomalin w glebie.....	18
2.3. Oznaczenia liczebności spor grzybów mykoryzowych.....	18
2.4. Oznaczenia aktywności biologicznej gleb.....	19
2.5. Analizy statystyczne.....	20
3. CEL BADAŃ	20
4. WYNIKI	20
4.1. Ocena zawartości glomalin w glebie spod uprawy pszenicy ozimej z uwzględnieniem systemów uprawy roli.....	20
4.2. Ocena zawartości glomalin w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze z zastosowaniem różnych technik przygotowania gleby do siewu.....	27
4.3. Ocena zawartości glomalin w reprezentatywnych glebach pochodzących z krajowego monitoringu gleb ornych Polski.....	34
4.4. Ocena zawartości glomalin oraz aktywności biologicznej w reprezentatywnych glebach na przykładzie gleb pochodzących z województwa lubelskiego.....	43
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	51
6. FORMA OPRACOWANIA WYNIKÓW BADAŃ	54
7. LITERATURA	58

1. WPROWADZENIE

Jednym z podstawowych i charakterystycznych składników gleby jest substancja organiczna [38]. W jej skład wchodzi wszystkie obumarłe szczątki roślinne, zwierzęce, szczątki licznych drobnoustrojów oraz grzybów, jak również organiczne produkty ich rozkładu nagromadzone w różnej postaci w glebie i na jej powierzchni. Martwa substancja organiczna i produkty jej biochemicznych przemian decydują o korzystnym układzie całego kompleksu właściwości gleby, od których z kolei zależy jej żyzność i produktywność [29]. Substancja organiczna odgrywa główną rolę w tworzeniu gruzełkowatej struktury gleby, ma bardzo duży wpływ na infiltrację wody, rozwój korzeni i odporność na erozję. Materia ta jest także magazynem składników pokarmowych i warunkuje pojemność absorpcyjną dla kationów [37].

Od wielu lat oddziaływanie pomiędzy glebą a korzeniami roślin i wpływ roślin na skład i cechy gleby są przedmiotem badań [27, 35, 74, 75]. Jednym z najważniejszych przykładów symbiozy jest związek pomiędzy roślinami i grzybami mykoryzy arbuskularnej (*arbuscular mycorrhizal fungi* AMF) [27, 39]. Grzyby mykoryzowe towarzyszą roślinom w ewolucji od czasów opanowania przez nie środowiska lądowego. Wspomagają adaptację roślin do nowych warunków: deficytu wody, przyswajanie składników pokarmowych, zmian temperatury, promieniowania UV i innych czynników potencjalnie stresogennych dla roślin [7, 10, 33, 42].

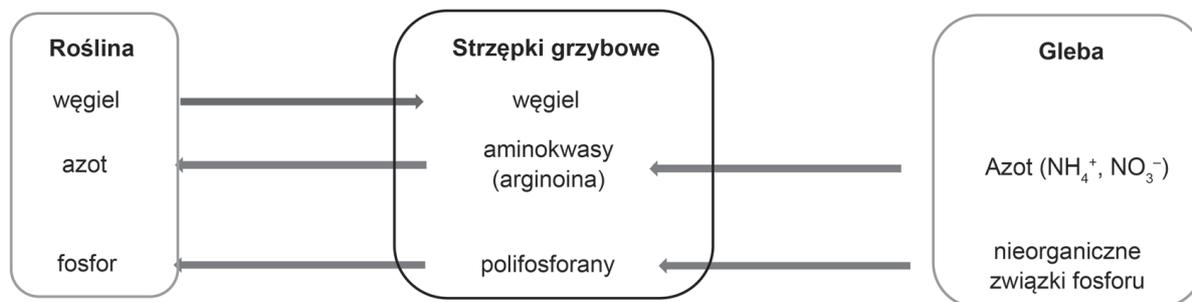
Badania mykoryz zaowocowały niedawno odkryciem glomaliny – glikoproteiny produkowanej przez grzyby mykoryzy arbuskularnej głównie z rodzaju *Glomus* [74, 75]. Pomimo szerokiej wiedzy na temat korzystnego oddziaływania grzybów mykoryzowych na wzrost i rozwój roślin nadal stosunkowo niewiele wiadomo o dodatkowej roli środowiskowej tych grzybów, związanej z wytwarzaniem glomaliny i jej obecności w glebie. W naszym kraju nie prowadzono dotychczas szczegółowych badań nad tą substancją. Niniejsze opracowanie jest próbą podsumowania dotychczasowej wiedzy na temat glomaliny, jej budowy, funkcji oraz występowania w glebach uprawnych Polski.

1.1. Arbuskularne grzyby mykoryzowe (AMF)

Powszechnie występującymi grzybami glebowymi, o kluczowym znaczeniu dla roślin, są arbuskularne grzyby mykoryzowe [17, 24, 27]. Symbioza grzybów AMF z roślinami jest prawdopodobnie najstarszym i najpowszechniej występującym na świecie związkiem pomiędzy grzybem a rośliną [33, 42]. Zewnętrzne struktury grzybów AMF to penetrujące

glebę strzępki i pojedyncze spory spoczynkowe. Spory wytwarzane są bezpłatnie ze strzępek grzybowych, które służą rozmnażaniu i przetrwaniu tych grzybów w glebie. Symbiozę tę nazywa się symbiozą arbuskularną (AM), ponieważ jedyną strukturą obecną w komórkach miękiszowych korzeni roślin są arbuskule, tj. rozgałęzione końce strzępek, które biorą udział w dwustronnej wymianie węgla, fosforu i innych fizjologicznie znaczących cząstek [17, 35, 42, 53]. Symbioza AM jest powszechna w glebach o pH bliskim naturalnego, zawierających przyswajalny azot mineralny. Fosfor jest często składnikiem występującym w tych warunkach w ograniczonej ilości [52]. Wymiana składników pokarmowych zachodzi pomiędzy rozgałęzionymi strzępkami grzybni a błoną komórkową rośliny, która nie ulega rozerwaniu (Rys. 1) [20, 52, 54].

Rys. 1. Korzyści wynikające z symbiozy roślin z grzybami AMF.



stotą symbiozy AM jest wpływ na:

- *odżywianie, udostępnianie i pobieranie fosforu, azotu, mikroelementów oraz przemieszczanie asymilatów,*
- *ochronę przed stresami abiotycznymi (susza, zasolenie, pH i temperatura) oraz stresem biotycznym (patogenami glebowymi, nicieniami, infekcje liściowe).*
- *procesy fizjologiczne (fotosynteza, gospodarka wodna, wymiana gazowa).*
- *procesy biochemiczne (aktywność enzymatyczną).*
- *poprawę struktury gleby (agregaty wodoodporne, produkcja glomaliny).*

Endomykoryza dominuje wśród roślin zielonych (co najmniej u 70–80% roślin na kuli ziemskiej), a stopień zasiedlenia korzeni rośliny przez grzyby mykoryzowe i ich aktywność podlega zmianom podczas sezonu wegetacyjnego [27]. Symbioza ta jest tworzona z wieloma trawami, niemal ze wszystkimi roślinami użytkowymi rolniczo, w tym także z roślinami bobowatymi oraz niektórymi drzewami i krzewami [17]. Stopień zasiedlenia korzeni zwiększa się do fazy dojrzałości rośliny, jest często równocześnie sygnałem do zwiększonego wytwarzania spor przez strzępki pozakorzeniowe. Grzyby endomykoryzowe charakteryzują się zasiedleniem tkanki korzeniowej rośliny zarówno w przestrzeni międzykomórkowych jak i we wnętrzu komórek. Kolonizacja wnętrza korzeni przez strzępki grzybów

endomykoryzowych powoduje zmiany zarówno morfologiczne jak i fizjologiczne u obu symbiontów, w tym zmianę składu i ilości wydzielin korzeniowych oraz produkcję glomaliny [33, 47, 75]. Grzyby AMF zostały zaklasyfikowane do gromady *Glomeromycota* (Tabela1).

Tabela 1. Systematyka grzybów AMF [7].

Gromada	<i>Glomeromycota</i>			
Klasa	<i>Glomeromycetes</i>			
Rząd	<i>Glomerales</i>	<i>Paraglomerales</i>	<i>Archaeosporales</i>	<i>Diversisporales</i>
Rodzina	<i>Glomeraceae</i>	<i>Paraglomaceae</i>	1. <i>Ambisporaceae</i> 2. <i>Archaeosporaceae</i> 3. <i>Geosiphonaceae</i>	1. <i>Acaulosporaceae</i> 2. <i>Diversisporaceae</i> 3. <i>Entrophosporaceae</i> 4. <i>Gigasporaceae</i> 5. <i>Pacisporaceae</i>
Rodzaj	<i>Glomus</i>	<i>Paraglomus</i>	1a. <i>Ambispora</i> 1b. <i>Archaeospora</i> 2. <i>Intraspora</i> 3. <i>Geosiphon</i>	1a. <i>Acaulospora</i> 1b. <i>Kuklospora</i> 1c. <i>Acaulospora</i> 2a. <i>Diversispora</i> 2.b. <i>Otophora</i> 3. <i>Entrophospora</i> 4a. <i>Gigaspora</i> 4b. <i>Scutellospora</i> 5. <i>Pacispora</i>
Grupy	<i>Glomus</i> – A <i>Glomus</i> - B			
Niektóre gatunki z rodzaju <i>Glomus</i> produkujące glomaliny:				
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Glomus mosseae</i> - <i>Glomus etunicatum</i> - <i>Glomus fasciculatum</i> - <i>Glomus caledonium</i> - <i>Glomus clarum</i> - <i>Glomus intraradices</i> - <i>Glomus macrocarpus</i> 				

Gromada ta obejmuje jedną klasę *Glomeromycetes*, cztery rzędy (*Archaeosporales*, *Diversisporales*, *Glomerales*, *Paraglomerales*), 10 rodzin (*Acaulosporaceae*, *Ambisporaceae*, *Archaeosporaceae*, *Diversisporaceae*, *Entrophosporaceae*, *Geosiphonaceae*, *Gigasporaceae*, *Glomeraceae*, *Pacisporaceae*, *Paraglomerales*) i 15 rodzajów (*Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Intraspora*, *Geosiphon*, *Otophora*, *Pacispora*, *Paraglomus*, *Racocetra*, *Scutellospora*, *Umbospora*), które wyodrębniono w oparciu o budowę zarodników, morfologię grzyba oraz analizy genetyczne, głównie na podstawie filogenetycznej analizy sekwencji genu SSU rRNA [57]. Poznana jest

dokładna filogeneza oraz taksonomia *Glomeromycota* wraz z bazą ok. 230 gatunków AMF [56]. Za produkcję glomalin odpowiedzialne są głównie grzyby z rodzaju *Glomus* [57]. U pozostałych przedstawicieli gromady *Glomeromycota* nie stwierdzono zdolności wytwarzania glomalin za wyjątkiem niewielkich ilości glomalin produkowanych przez rodzaj *Gigaspora* i *Acaulospora* [31].

Rodzaj *Glomus* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, ponadto w obrębie tego rodzaju wyodrębniono dwie grupy, nie mające statusu taksonomicznego – *Glomus-A* i *Glomus-B* [7]. Grupa *Glomus-A* skupia gatunków, których ściana zarodników nie posiada wewnętrznej, giętkiej warstwy. Grupę tę reprezentują m.in. *Gl. caledonium*, *Gl. coronatum* Giovannetti i *Gl. verruculosum* [7]. Głównymi gatunkami tworzącymi grupę *Glomus-B* są *Gl. claroideum* i *Gl. lamellosum*. Wspólną cechą tych grzybów jest wewnętrzna, giętka warstwa ściany ich zarodników, która u drugiego gatunku barwi się różowo do czerwonego w odczynniku Melzera [7, 57]. Do najczęściej spotykanych gatunków grzybów z rodzaju *Glomus* produkujących glomaliny zaliczamy: *Glomus mosseae* (zakażający m.in. bób, bobik *Vicia faba* i pory *Allium porrum*) i *Glomus fasciculatum* znany jako partner (soi *Glycine max*) (Tabela 1).

1.2. Budowa i właściwości glomalin

Już w latach 90-tych XX wieku prowadzono badania nad obecnością i udziałem węglowodanów w tworzeniu agregatów glebowych oraz wykazano pozytywne korelacje pomiędzy trwałością agregatów glebowych a ilością węglowodanów ekstrahowanych z gleby [47]. 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 [48]. Badania te stały się podstawą do dalszych analiz zawartości C, H i N w agregatach glebowych, co przyczyniło się do odkrycia glomalin [75].

Glomaliny to bardzo charakterystyczne pod względem budowy i właściwościach fizykochemicznych białka grzybowe [12]. Są to stabilne cząsteczki białkowe, nierozpuszczalne w wodzie i odporne na degradację stabilizujące agregaty glebowe i chroniące je przed rozbięciem [37]. Pomimo wielu lat badań do tej pory nie udało się dokładnie określić budowy glomaliny. Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań wiadomo, że jest to silnie hydrofobowa glikoproteina z łańcuchem oligosacharydowym na N-końcu [72, 77]. To właśnie hydrofobowe domeny molekuly są odpowiedzialne za trudności w ich ekstrakcji i małą rozpuszczalność. Wiadomo, iż pod względem biochemicznym glomalina

składa się z podjednostki białkowej i cukrowej, a główne pierwiastki wchodzące w skład jej budowy to: azot, węgiel, wodór, tlen, fosfor i żelazo (Tabela 2) [72].

Tabela 2. Skład procentowy pierwiastków w budowie cząsteczki glomaliny.

Pierwiastek	Udział procentowy [%]
azot	od 1% do 5%
węgiel	od 36% do 59%
wodór	od 4% do 6%
tlen	od 33% do 49%
fosfor	od 0,03% do 0,1%
żelazo	od 0,8% do 8,8% Fe

Zmienny skład pierwiastkowy w składzie budowy glomaliny zależy przede wszystkim od gatunku grzyba produkującego białko oraz warunków środowiskowych. Żelazo obecne w składzie glomaliny po pierwsze nadaje brunatno-czerwony odcień ekstraktowi białka, a po drugie jest odpowiedzialne za odporność roślin na stres i patogeny [68].

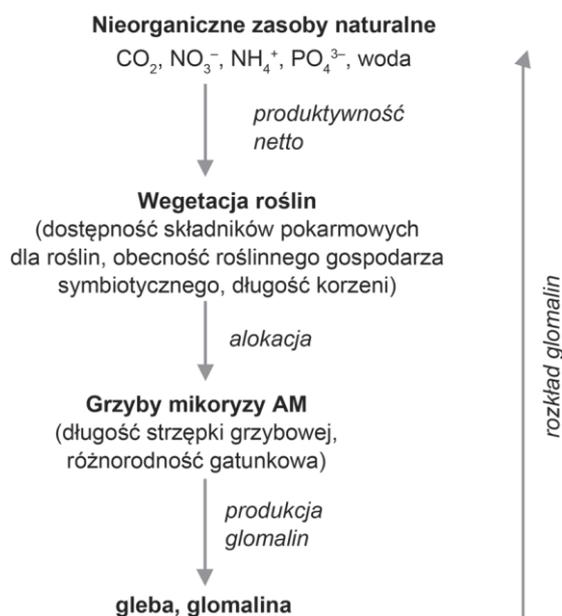
Wyniki szeregu technik pomiarowych wykazały odmienną budowę strukturalną glomaliny niż kwasu huminowego czy fulwowego oraz inny rozkład podjednostek białkowych i cukrowych w porównaniu do znanych już molekuł stanowiących glebową frakcję organiczną [56]. Ponadto zespół naukowy pod kierunkiem Sary Wright wykazał, że waga glomaliny jest od 2–24 razy większa niż kwasu huminowego, przy czym wiadomo, że kwas ten stanowi zaledwie 8% zawartości węgla w glebie [71]. 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.

1.3. Produkcja i rozkład glomaliny

Produkcja i magazynowanie glomaliny następuje w strzępkach grzybów endomykoryzowych (Rys. 2) [10]. Strzępki mogą rosnąć nawet kilkanaście centymetrów ponad korzeniami uzyskując w ten sposób większy dostęp do substancji odżywczych zawartych w glebie. Analizy przy użyciu ilościowych metod immunoenzymatycznych m.in. metodą ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) i przeciwciał monoklonalnych wykazały dokładną lokalizację glomaliny we wnętrzu grzybni, dzięki czemu możliwe stało się wyjaśnienie sposobu rozmieszczenia i transportu tegoż białka do gleby [68]. Początkowe badania Wright i Upadhyaya [68] przy użyciu technik immunofluorescencyjnych wykazały,

że glomalina zlokalizowana jest głównie na powierzchni strzępek i spor grzybów AMF, i jako hydrofobowa warstwa okrywa grzybnię i chroni ją przed jej degradacją przez inne mikroorganizmy, a także zwiększa sztywność i trwałość ścian komórkowych ułatwiając rozprzestrzenianie się strzępek w glebie [75]. Uważano wówczas, iż glomaliny są białkowymi wydzielinami tylko żywych strzępek grzybowych [75], a „złuszczająca się” ze strzępek glomalina zostaje na korzeniach, okrywa resztki organiczne i cząstki glebowe, łącząc je ze sobą i tym samym utrzymując trwałość agregatów glebowych. Wright i Upadhyaya [74] zakładały, iż glomaliny na zasadzie transportu wymiennego, w momencie pobierania wody i składników odżywczych przez strzępki grzybowe, zostają „wyrzucone” na zewnątrz grzybni. Uważa się, iż podobnie jak translokacja fosforu wewnątrz grzybów AMF również i przemieszczanie się glomaliny w obrębie strzępki odbywa się poprzez ruch cytoplazmy [48, 49, 52].

Rys. 2. Produkcja i rozkład glomalin w glebie



Dopiero badania Driver i współpracowników [11] podważyły tę hipotezę. Udowodniono bowiem, iż glomaliny są produkowane i magazynowane nie tylko podczas intensywnego wzrostu strzępki, ale również są przekazywane do gleby po obumarciu grzyba na skutek rozkładu grzybni (Rys. 2). Według tej teorii żywe strzępki grzyba nie wydzielają dużej ilości glomaliny do gleby, dopiero po rozkładzie grzybni większość zasobów glomaliny jest uwalniana do gleby [11]. W miarę starzenia się strzępek pozakorzeniowych oraz korzeni roślin, biomasa grzybni ulega degradacji podczas gdy glomalina nie ulega rozkładowi.

Większość jej, na ogół w niezmienionej formie, pozostaje w glebie [46]. Ilość obecnych w glebie glomalin nie jest jednak równoznaczna z produkcją tej substancji przez grzyba i jego późniejszym rozkładem ale w dużej mierze wiąże się ze środowiskiem w jakim następuje mykoryza [43]. Warunki środowiskowe mają decydujący wpływ na efektywność symbiozy grzyba z rośliną a tym samym na produkcję glomaliny. Według Rilliga i Mummey'a [42] produkcja i rozkład glomaliny w środowisku glebowym wiąże się z wieloma czynnikami zarówno odnoszącymi się do fizyko-chemicznych właściwości gleby, jak i rośliny oraz gatunku grzyba tworzącego symbiozę AM. Struktura gleby i jej właściwości chemiczne mają istotny wpływ na wzrost grzybni, a tym samym na zawartość glomaliny w strzępkach grzybowych [46].

Według Rilliga i Steinberga [46] ilość glomalin obecnych w glebie może stanowić aż 5% węgla organicznego w glebie i azotu. Mimo, iż glomalina może stanowić istotny rezerwar C i N w glebie to jednak mechanizm i ekofizjologiczne funkcje tego procesu nie są dokładnie poznane. Również tempo produkcji glomaliny przez grzyby AMF nie jest dokładnie określone. Wright i Upadhyaya [71] wykazały, iż w kontrolowanych warunkach podczas 14 tygodni wzrostu roślin tworzących symbiozę z określonym gatunkiem grzyba AMF produkcja glomaliny w zależności od gatunku grzyba wahała się od 100 do 168 mg EE-IRSP m⁻² folii ogrodniczej.

Rillig i współautorzy zakładali, iż ilość wytworzonej glomaliny powinna korelować liniowo z długością strzępek korzeniowych [44], bowiem dobrze rozwinięty system korzeniowy rośliny zapewnia większą dostępność do składników pokarmowych m.in. CO₂, NH₄⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻ i wody. Z kolei Nichols i Wright [36] zakładały, iż największy wpływ na produkcję glomalin mają biologiczne właściwości gleby (głównie aktywność mikrobiologiczna gleby) oraz właściwości fizykochemiczne tj. struktura gleby, zawartość substancji ilastych (zapewniających fizyczną ochronę). Glomaliny obecne w glebie okrywają strzępki grzybni utrzymując wodę i składniki odżywcze przed utratą w drodze do i z rośliny [71]. Według Nichols i Wright [36] ilość węgla organicznego obecnego w strzępkach grzybowych stanowi od 5 do 90 C g m⁻². Natomiast Lovelock i inni [31] ocenili, iż zawartość glomaliny w tej biomase stanowi niewielki odsetek (0,4–6%).

Istnieje wiele badań dotyczące korelacji pomiędzy zawartością glomaliny w glebie a długością strzępek grzybowych [31, 36, 44]. Badania te nie wykazały jednoznacznie związku pomiędzy stężeniem tegoż białka w glebie a długością strzępki.

Badania Lovelock i współautorów [31] dotyczące oszacowania wydajności produkcji glomalin przez grzyby AMF prowadzone były w warunkach kontrolowanych na

inkubowanych glebach lasów tropikalnych w Kostaryce oraz na piaszczystych glebach pod uprawą kukurydzy w Maryland USA. Produkcja łatwoekstrahowalnego immunoaktywnego białka glebowego EE-IRSP (*easily extractable immunoreactive soil protein*) po zaszczepieniu grzybnią mykoryzowa gleb w lasach deszczowych Kostaryki wahała się od 3,6 do 16,7 gEE-IRSP kg⁻¹ strzępki podczas 4 tygodniowej inkubacji, natomiast na glebie pod uprawą kukurydzy od 1,2 do 6,5 g EE-IRSP kg⁻¹ strzępki [31].

Lovelock i współautorzy [31] wykazali, iż ilość białka EE-IRSP nie jest skorelowana z długością grzybni AMF. Wraz z przyrostem strzępki grzybowej wydajność produkcji glomaliny (w mikrogramach glomaliny na metr strzępek) w zależności od gatunku grzyba istotnie zmniejszyła się. Produkcję znaczących ilości glomaliny stwierdzono głównie u gatunków z rodzaju *Glomus* [75]. W badaniach Wright i Upadhyaya [71] dotyczących monokultury grzybów hodowanych w warunkach laboratoryjnych *Gigaspora rosea* i *Gigaspora gigantea* wykazano większą produkcję białka EE-IRSP w porównaniu do *Glomus intraradices* i *Glomus etunicatum*. Gatunki *Gigaspora rosea* i *Glomus caldonium* produkowały od 30 do 43% więcej EE-IRSP niż w przypadku *Glomus intraradices* [71]. W doświadczeniach polowych wyższe stężenia glomaliny stwierdzano dla gatunków *Glomus* [67, 71].

Za brak korelacji pomiędzy długością strzępki AMF i stężeniem glomaliny produkowanej przez dany gatunek może być odpowiedzialny szereg mechanizmów biotycznych i abiotycznych. Dla przykładu, średnica strzępki grzybowej może zmieniać się między próbkami, więc odcinki grzybni o różnej grubości nie stanowią dobrego wskaźnika produkcji glomaliny [31]. Również czas degradacji strzępki grzybowej i uwolnienia glomaliny do gleby jest zależny od gatunku grzyba [49, 51]. Czas rozkładu glomaliny szczególnie w środowisku naturalnym nie jest dobrze udokumentowany. Z doświadczeń laboratoryjnych wynika, iż czas rozkładu białka waha się w zależności od warunków środowiska i gatunku grzyba od kilku dni do kilku miesięcy [49].

Rilling i wsp. [48] wykazali stosując węgiel aktywny 14C, że okres całkowitego rozkładu glomaliny w glebach może wynosić nawet kilkanaście lat, a podatność na rozkład tych cząsteczek związanych z minerałami glebowymi lub z humusem może być jeszcze mniejsza.

Glomaliny ekstrahowane z gleby są bardzo podobne do glomaliny ekstrahowanych z pojedynczych kultur grzybowych pochodzących z doświadczeń laboratoryjnych. Badania te prowadzono w oparciu o metody: elektroforezy żelowej białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) [67], spektroskopii

magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (*nuclear magnetic resonance*) [48] elektroforezy kapilarnej [72] oraz analizy C, H, N [13, 48]. Istnieją zaledwie niewielkie różnice pomiędzy próbkami glomalin ekstrahowanych z gleby i z kultur grzybowych *in vitro* [13]. Różnice te nie wynikają z budowy samej cząsteczki glomaliny ale jedynie z zawartości procentowej jej pojedynczych komponentów (C, N, P, Fe). Różnice te wydają się wynikać głównie z warunków wzrostu poszczególnych gatunków *Glomus* (temperatura, wilgotność, gleba, roślina). Badania Steinberg i Rilliga [61] dotyczące przechowywania gleby uwilgotnionej inkubowanej w ciemności w 18°C potwierdzają niewielkie różnice w zawartości glomaliny. Podczas inkubacji gleby długość strzępek spadła o 60% po 150 dniach inkubacji natomiast zawartość glomalin ogólnych spadła o 25%, z kolei zawartość białek IRTG (*immunoreactive total glomalin*) zniknęła prawie całkowicie, zawartość łatwoekstrahowalnych glomalin EEG (*easily extractable glomalin*) nie uległa zmianie, natomiast zawartość białka IREEG – immunoreaktywnych łatwoekstrahowalnych glomalin (*immunoreactive easily extractable glomalin*) wzrosła pięciokrotnie. W innym doświadczeniu [44] zawartość glomalin ogólnych zmniejszyła się o 48 do 81% a glomalin łatwoekstrahowalnych o 51 do 88% po 413 dniach inkubacji próbek glebowych w ciemności w temperaturze 20°C.

1.4. Występowanie glomalin

Glomaliny występują powszechnie w różnych typach. Znalezione je zarówno w glebach uprawianych rolniczo, glebach leśnych, łąkowych oraz nieużytkach rolnych. Skład szaty roślinnej biomu jest charakterystyczny dla określonego klimatu, choć bogactwo gatunków może być różne w zależności od położenia geograficznego i historii flory. Największe stężenie glomaliny odnotowano w tropikalnych glebach leśnych na Hawajach (ponad 100 mg · g⁻¹ gleby) [45, 48], natomiast najniższe stężenie glomaliny (poniżej 1 mg · g⁻¹ gleby) stwierdzono w glebach pustynnych [45]. 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 [30, 31].

W badaniach Wright i Upadhyaya [73] na glebach leśnych stwierdzono zawartość glikoproteiny mieszczącej się w przedziale od 21 mg do 150 mg na g gleby. Zawartość glomaliny w glebach uprawnych Ameryki Południowej wahała się od około 2 mg do 15 mg · g⁻¹ s.m. gleby [36].

Skład szaty roślinnej biomu oraz właściwości fizykochemiczne i biologiczne gleb, w tym zawartość węgla organicznego ma duże znaczenie w produkcji glomalin przez grzyby AMF. Aktywnie rozwijające się strzępki grzybów w glebie leśnej mogą wytwarzać od około 4 do prawie 17 mg glomaliny na miligram suchej masy grzybni [73].

W glebach uprawianych rolniczo w strefie klimatu umiarkowanego można stwierdzić ogólną zawartość glomaliny w zakresie od 0,35–0,75 g · kg⁻¹ gleby [69]. W glebach użytków zielonych (łąka, pastwisko) klimatu umiarkowanego zawartość glomalin mieści się w zakresie od 0,2–2,7 g · kg⁻¹ gleby [32, 36]. Zawartości te są znacznie wyższe w glebach leśnych klimatu umiarkowanego i mieszczą się w zakresie 0,6–5,8 g · kg⁻¹ gleby [26, 62]. Z kolei w borealnych lasach klimatu umiarkowanego (tajga) charakteryzującego się szerokim zakresem zmian temperaturowych (od –30°C do +20°C) zawartość glomalin przekracza 1 g · kg⁻¹ gleby [26]. Znacznie wyższe wartości glomalin ogólnych (3–14 g · kg⁻¹ gleby) można natomiast stwierdzić w tropikalnych lasach deszczowych [30]. Panujący tam mikroklimat charakteryzujący się wysoką temperaturą o niskich amplitudach dobowych i rocznych oraz wysokiej wilgotności powietrza sprzyja rozwojowi grzybów mykoryzowych a tym samym produkcji glomaliny. Najniższe zawartości glomaliny stwierdzono natomiast w glebach pustynnych, zaledwie 0,003–0,12 g · kg⁻¹ gleby [45]. Gleby te występujące na obszarach o bardzo niskim zakresie opadów od 100 do 150 mm w ciągu roku oraz bardzo słabo zaznaczonym poziomie próchnicznym i silnym zasoleniu. Takie warunki nie są korzystne do rozwoju szaty roślinnej a tym samym symbiozy z grzybami mykoryzowymi.

Większość badań nad zawartością glomalin w glebie prowadzona była w powierzchniowej jej warstwie (0–30 cm), niemniej jednak znane są również badania prowadzone w głębszych warstwach gleby. Singh i inni stwierdził obecność glomaliny nawet na głębokości 140 cm profilu gleby [59]. Znaczne zawartości glomaliny stwierdzono także na glebach zalewowych w dolinach rzecznych i osadzie. W osadzie rzeczonym potwierdzono stężenie glomalin w ilości 9.66 mg · g⁻¹ [60].

1.5. Terminologia i metodyka oznaczeń glomalin

W terminologii dotyczącej glomalin możemy wyróżnić cztery główne grupy nazewnictwa w zależności od zastosowanej metodyki oznaczeń. Są to: białko glebowe oznaczane metodą Bradford (BRSP), łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metodą Bradford (EE-BRSP), immunoreaktywne białko glebowe (IRSP) oraz łatwoekstrahowalne immunoreaktywne białko glebowe (EE-IRSP) (Tabela 3) [43, 51]. Nazewnictwo to dotyczy

zarówno procesu ekstrakcji (glomalin ogólnie i glomalin łatwoekstrahowalne) oraz metody ich oznaczenia (metoda Bradford, metoda ELISA).

Ze względu na małą rozpuszczalność w wodzie ekstrakcję glomalin prowadzi się w wysokiej temperaturze (121°C) w buforze cytrynianowym o odczynie neutralnym lub alkalicznym [36, 74]. Łatwoekstrahowalne frakcje glomalin (EEG) z gleby ekstrahuje się 20 mM buforem cytrynianowym pH 7,0 przez 30 minut przy 121°C, natomiast ogólną zawartość glomalin (TG) wyznacza się przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego przy pH 8,0 przez 60 minut w temp. 121°C, według metody opisanej przez Wright i Upadhyaya [74, 75].

W celu określenia stężenia glomalin stosuje się metodę ilościowego oznaczania białka opisaną przez Bradford [8]. Metoda Bradford wykorzystuje fakt przesunięcia maksimum absorpcji roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 z 465 nm do 595 nm po związaniu z białkiem. Cząsteczka barwnika CBB oddziałuje poprzez grupy SO₃– z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi. Z barwnikiem reagują głównie reszty argininy, w mniejszym stopniu reszty histydyny, lizyny, tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny. Błękit brylantowy Coomassie G-250 w środowisku kwaśnym ma brunatne zabarwienie, które po reakcji z białkiem zmienia się na błękitne. Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości białka w roztworze [8, 22, 74]. Pomiar spektrofotometryczny zmiany barwy roztworu białka odczytuje się przy długości fali 590 nm (A₅₉₀), przy użyciu surowiczej albuminy wołowej (BSA) jako standardu w zakresie od 1,25 do 50 µg (BSA) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS). Z uzyskanej krzywej wzorcowej odczytuje się zawartości glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych [43].

Terminologię stosowaną w pracach analizy glomalin podano w Tabeli 3 na podstawie publikacji Rilliga [43]. Oprócz znanego w literaturze nazewnictwa glomalin (TG, EEG) Rilliga [43] zaproponował także definicję tzw. białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) oraz tzw. białek glebowych oznaczanych metodą Bradford (*Bradford-reactive soil protein* BRSP) [54].

W przypadku określenia ogólnej zawartości glomalin (TG) stosuje się również test immunoenzymatyczny tzw. metodę ELISA jeden z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach biologicznych, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych. Służy on do wykrycia określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem [59, 60]. Przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomalin są przeciwciała MAb32B11 [68].

Tabela 3. Terminologia glomalin [62].

Terminologia	Symbol	Opis
glomalina	-	glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej; jeszcze nie do końca zidentyfikowany produkt genowy grzybów AMF
glomaliny ogólne (ang. <i>total glomalin</i>)	TG	frakcja glomalin gleby kilkukrotnie ekstrahowana przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego (pH 8,0), w autoklawie w temperaturze 121°C przez 60 minut,
glomaliny łatwoekstrahowalne (ang. <i>easily extractable glomalin</i>)	EEG	frakcja glomalin gleb ekstrahowana raz przy użyciu 20 mM buforu cytrynianowego (pH 7,0) w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut
białko glebowe spokrewnione z glomalinami (ang. <i>glomalin-related soil protein</i>)	GRSP	stanowi łączny udział glomaliny w glebie, ewentualnie zawiera inne białko gleby; jest to frakcja glomalin gleby jednokrotnie ekstrahowana przy użyciu 50 mM buforu cytrynianowego (pH 8,0), w autoklawie w temperaturze 121°C przez 60 minut, uzyskany roztwór ma kolor słomkowy
łatwoekstrahowalne białka glebowe spokrewnione z glomalinami (ang. <i>easily extractable glomalin-related soil protein</i>)	EE-GRSP	łączna frakcja glomalin łatwoekstrahowalnych oraz innych białek glomalinopodobnych spokrewnionych z glomalinami; frakcja glomalin gleb ekstrahowana raz przy użyciu 20 mM buforu cytrynianowego (pH 7,0) w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 minut
białko glebowe oznaczane metoda Bradforda (ang. <i>Bradford-reactive soil protein</i>)	BRSP	ogólne białko glebowe oznaczone metodą Bradforda; łączne oznaczenie glomalin i innych białek w całym ekstrakcie glebowym; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin TG
łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metoda Bradforda (ang. <i>easily extractable Bradford-reactive soil protein</i>)	EE-BRSP	Łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone metoda Bradforda; łączne oznaczenie glomalin łatwoekstrahowalnych i innych białek w całym ekstrakcie glomalin; ekstrakcja przeprowadzona jak w przypadku glomalin EEG
immunoaktywne białko glebowe (ang. <i>immunoreactive soil protein</i>)	IRSP	białko glebowe oznaczone przy użyciu testu ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomalin MAb32B11; w tym przypadku nie mogą reagować inne białka poza glomalinami; ekstrakcja przeprowadzana jak w przypadku glomalin TG
łatwoekstrahowalne immunoaktywne białko glebowe (ang. <i>easily extractable immunoreactive soil protein</i>)	EE-IRSP	Łatwoekstrahowalne białko glebowe oznaczone przy użyciu testu ELISA z przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi dla glomalin MAb32B11; w tym przypadku nie mogą reagować inne białka poza łatwoekstrahowalnymi glomalinami; ekstrakcja przeprowadzona jak w przypadku glomalin EEG

Oznaczenia glomalin ogólnych mogą być często niemiarodajne, ponieważ oprócz typowych glomalin test może wykryć również inne białka należące do glebowej frakcji organicznej a niekoniecznie same glomaliny [34]. Bardziej wiarygodne w ocenie trwałości agregatów glebowych staje się więc oznaczenie białek EEG, których wartości mogą odzwierciedlać rzeczywistą zawartość glomalin w glebie [65, 66]. Tłumaczyć to można także tym, iż glomaliny ogólne charakteryzuje znacznie mniejsza immunoreaktywność w

porównaniu do łatwoekstrahowalnych glomalin, które można wykryć z użyciem przeciwciał monoklonalnych [68].

1.6. Funkcje glomalin

Glomaliny odgrywają znaczącą rolę głównie w tworzeniu gruzełkowej struktury gleby, ułatwiając zlepianie cząstek mineralnych [70, 73]. Białko to obkleja powierzchnię cząsteczek gleby, tworzy również charakterystyczną powłokę na ich powierzchni. Z badań Rillig i współpracowników [47] wynika, iż glomaliny stanowią około 2% ogólnej wagi agregatów glebowych oraz od 4 do 5% całkowitego C i N w glebach.

Tak więc, nawet tylko pod względem ilościowym frakcja glomaliny jest bardzo istotną frakcją glebowej materii organicznej [70]. Znając również właściwości glomaliny, a zwłaszcza jej hydrofobowość i wyżej wspomnianą trwałość w środowisku glebowym, łatwo mogli zakładać odkrywcy tej frakcji MO, że odgrywa ona ważną rolę w tworzeniu i stabilizacji gruzełkowej struktury gleb. Stąd też poprzez produkcję glomalin grzyby te budzą rosnące zainteresowanie jako potencjalny czynnik wspomagania wzrostu i zdrowotności roślin oraz poprawy struktury gleby.

Silnie hydrofobowy, polisacharydowy łańcuch glomalin jest odpowiedzialny także za wyłapywanie i przyłączanie do siebie drobnych cząstek glebowych a nawet mikroorganizmów. W ten sposób dobrze zagregowana struktura gleby utrzymuje odpowiednie przewietrzanie, wilgotność oraz odpowiedni skład komponentów niezbędnych do optymalnego wzrostu uprawianych roślin [19, 69]. Rola grzybów AMF w agregacji, a tym samym zwiększeniu infiltracji wody, ochronie materii organicznej (SOM) przed rozkładem, wzroście odporności gleb na erozję, wydaje się tak samo ważna, a może nawet ważniejsza niż rola w absorpcji składników pokarmowych. Dlatego kontrola wzrostu grzybów mykoryzowych i produkcja glomaliny mogą być przydatne do monitorowania pustynnienia i degradacji gleby [14]. W badaniach Franzluebbbers i innych [14] stabilność agregatów glebowych była słabiej skorelowana z zawartością glomalin, co autorzy tłumaczą wieloletnim charakterem poszczególnych systemów uprawy, a więc ustabilizowanym środowiskiem glebowym oraz dodatkowo wysoką zawartością materii organicznej w glebie.

Stwierdzono, że istnieje bardzo ścisła zależność pomiędzy długością strzępek grzybów w glebie a ilością w niej agregatów wodoodpornych [19]. Dotychczasowe badania z tego zakresu rzeczywiście wykazały istotne zależności pomiędzy zawartością glomaliny w 1–2 mm gruzełkach glebowych, a ich stabilnością (wodoodpornością) [69].

Ponadto udowodniono, że grzyby AMF chronią rośliny przed takimi patogenami, jak *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* a także przed atakiem nicieni [3]. Mechanizm obrony polega na tworzeniu bariery fizycznej i produkcji antybiotyków. Grzyby AMF oprócz węglowodanów i fosforu pobierają także cynk i miedź, a w warunkach deficytu tych pierwiastków znacznie podnoszą plony [48]. Badania nad ochroną roślin bobowatych zainfekowanych AMF – na przykładzie *Vicia faba* – rosnących na glebie o wysokiej zawartości manganu dowiodły, że mykoryza skutecznie chroniła je przed toksycznym działaniem tego pierwiastka [3]. Metale ciężkie wiązane są przez grupy karboksylowe związków pektynowych (hemicelulozy) wypełniających przestrzeń pomiędzy grzybem a komórką roślinną. Przypuszcza się, że w proces ten zaangażowane są także glomaliny [3].

W literaturze znana jest również rola glomalin w tolerancji roślin na stres [15, 18, 41]. Z badań Gadkar i Rilliga [15] wynika, iż glomaliny mogą być związane z białkiem szoku cieplnego *hsp60* (*heat shock proteins*). Ekspresja tych białek wzrasta kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, m.in. podwyższonej temperatury, ale również niskiej temperatury, stresu solnego, osmotycznego i metali ciężkich. Produkcja białek *hsp* może wzrastać także w odpowiedzi na infekcje, zapalenie, działanie toksyn, promieniowanie UV, głodzenie, niedotlenienie itp. Białka *hsp* działają jako białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe zwijanie się innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Porównanie glomalin z białkami szoku cieplnego może pozwolić na wyjaśnienia w jaki sposób stres dotykający komórki grzyba tj. metale ciężkie, skażenie gleby, zmiany klimatyczne może spowodować zwiększenie produkcji glomalin i wzrost grzybni [18, 41]. Niesprzyjające do wzrostu grzybów endomykoryzowych warunki mogą zatem być powodem zwiększenia przez nie produkcji glomalin – ochrona grzybni przyczynia się do możliwości wzrostu grzyba w skażonych glebach [25, 41].

1.7. Czynniki wpływające na spadek produkcji glomalin

Na produkcję glomalin ma wpływ wiele czynników zarówno środowiskowych, glebowych jak i klimatycznych. Podstawowy czynnikiem wpływającym na znaczną produkcję glomaliny są optymalne warunki do rozwoju grzybów AMF wynikiem czego jest aktywna symbioza pomiędzy rośliną a grzybem [63]. Stopień zasiedlenia korzeni roślin przez grzyby AMF może być regulowany dodatkowo przez podatność rośliny na infekcję jak i poprzez aktywność infekcyjną spor tych grzybów występujących w glebie, w której wzrasta dana roślina [63]. Liczebność i aktywność symbiotyczna grzybów AMF a tym samym wzrost produkcji glomaliny może być zwiększona zarówno poprzez modyfikację warunków

glebowych sprzyjających namnażaniu i aktywności spor, jak i przez wprowadzanie do ryzosfery wyselekcjonowanych drobnoustrojów wspomagających proces mykoryzacji. Głównymi wyznacznikami produkcji glomaliny są zarówno gatunek grzyba tworzącego symbiozę jak i rodzaj rośliny [62]. Znane są liczne prace, w których autorzy potwierdzają korelację wzrostu roślin z kolonizacją korzeni przez grzyby mykoryzowe. Idzie za tym również korelacja wzrostu rośliny i a tym samym produkcji glomaliny [63]. Szereg roślin tj. stokłosa bezostna (*Bromus inermis*), trawa sudańska (*Sorghum bicolor*), babka lancetowata (*Plantago lanceolata*) wykazuje aktywną symbiozę z grzybami AMF [27, 63]. W przypadku tych roślin stwierdzono istotny wzrost plonu z jednoczesnym stwierdzeniem znacznych ilości białka spokrewnionego z glomalinami (tzw. białka GRP) w korzeniach roślin i w glebie ryzosferowej [51]. W warunkach polowych, wpływ rośliny na produkcję glomaliny może być bardziej widoczny niż efekt obserwowany w kontrolowanych warunkach na przykładzie pojedynczego rodzaju rośliny i gatunku grzyba [62]. Wilson i inni [64] potwierdzili pewną specyfikę układu gatunkowego symbioz AMF i poziomu glomaliny w strzępkach grzybowych. Do czynników niekorzystnie wpływających na prawidłowe funkcjonowanie mykoryzy arbuskularnej należą m.in: uprawa mechaniczna, stosowanie środków ochrony roślin, intensywne nawożenie, wprowadzenie zanieczyszczeń z nawozami naturalnymi [43]. Również właściwości fizykochemiczne gleb oraz stosowany system uprawy roli ma istotny wpływ na zawartość glomaliny w glebie [50, 65].

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. Materiał glebowy

Badania przeprowadzono w oparciu o próbki glebowe pochodzące zarówno z lokalnych wieloletnich doświadczeń polowych jak i z Krajowego Monitoringu Gleb Ornych Polski. Próbki glebowe użyte w badaniach pochodziły z:

1. wieloletniego doświadczenia polowego z systemami produkcji rolniczej założonego w 1994 roku w Stacji Doświadczalnej w Osinach. Systemy produkcji objęte badaniami to ekologiczny (EKO), integrowany (INT), konwencjonalny (KONW) oraz monokultura (MONO). Próbki glebowe pobierano w latach 2015-2017 latem po zbiorach pszenicy ozimej odmiany Jantarka z następujących warstw profilu gleby: 0-5cm, 5-10cm, 10-15 cm, 15-25cm oraz 25-35 cm.
2. wieloletniego doświadczenia polowego z technikami przygotowywania gleb do siewu na przykładzie kukurydzy uprawianej w długoletniej monokulturze w RZD w

Grabowie. Próbkę glebowe pobierano w latach 2015-2017 w następujących terminach: przed siewem, w fazie 6 liści, 12 liści, kwitnienia oraz po zbiorach.

3. krajowego monitoringu chemizmu gleb ornych Polski. Próbkę glebowe zostały pobrane w 2015 roku przez pracowników Zakładu Gleboznawstwa Eroзии i Ochrony Gruntów. Program ten obejmuje 216 lokalizacji reprezentujących użytki rolne, głównie grunty orne. Baza danych charakteryzujących gleby w miejscu pobrania próbek obejmuje szereg właściwości, takich jak odczyn, zasolenie, poziom zanieczyszczenia metalami i zanieczyszczeniami organicznymi, zawartość węgla i składników nawozowych, skład granulometryczny i inne (www.gios.gov.pl/chemizm_gleb/).

2.2. Oznaczenia stężenia glomalin

Z badanych próbek glebowych wyekstrahowano glikoproteiny glebowe oznaczając zarówno glomaliny ogólne (TG), łatwoekstrahowalne (EEG) jak i białka glebowe spokrewnione z glomalinami (GRSP).

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 kilkakrotnie, 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.

2.3. Oznaczenia liczebności spor grzybów mykoryzowych

Izolację spor grzybów mykoryzowych przeprowadzono według metodyki Philips i Hayman, 1970. Zasiedlenie korzeni przez grzyby AMF oznaczano metodą mikroskopową – po wypreparowaniu próbki korzeni i jej wybarwieniu błękitem trypanowym wykonywano preparaty na szkiełkach podstawowych (korzenie zawieszano w poliwinylu-laktoglicerolu – PVLG). Wykonywano po dwa slajdy z każdej próbki – stopień zasiedlenia określano jako % zasiedlenia korzeni przez strzępki, arbuskule i wezikiule grzybów AMF.

Liczebność spor grzybów AMF oznaczano w uśrednionych próbkach 100 g powietrznie suchej gleby (2 x 50g), przy czym liczone były oddzielnie spory AMF wydzielone na filtrach o średnicach oczek 150, 50 i 75 mikrometrów, które po zsumowaniu dają liczebność spor w danej próbce glebowej (w przedziale wielkości od 400 do 50 mikrometrów).

2.4. Oznaczenia aktywności biologicznej gleb

Oznaczenia aktywności biologicznej gleb obejmowały:

1. Aktywność enzymatyczną gleby:
 - a). aktywności dehydrogenaz (Caside, 1964)
 - b). aktywności fosfataz zasadowej i kwaśnej (Tabatabai i Bremner, 1969).
2. Liczebność drobnoustrojów glebowych:
 - b). Ogólną liczebność grzybów (Martin 1950)
 - c). Ogólną liczebność bakterii (Wallace R., Lockhead A. 1950)
 - g). Ogólną liczebność *Azotobacter* spp. (Fenglerowa 1965)
 - h). Ogólną liczebność bakterii amonifikacyjnych (Hattori, Hattori 1980)
 - i). Ogólną liczebność bakterii rozpuszczających fosforany (Sharma et al., 2011)
3. Biomase mikroorganizmów, metoda fumigacji – ekstrakcji PN-ISO 14240-2.
4. Ocenę profilu metabolicznego gleby (community level physiological profiles – CLPP). Metoda ta jest stosowna w badaniach zmian złożonych zespołów mikroorganizmów zachodzących pod wpływem biotycznych i abiotycznych czynników. Na podstawie uzyskanych profili metabolicznych gleby możemy otrzymać zarówno informację o dostępności i/lub niedostępności do katabolizowanych substratów przez badane zespoły mikroorganizmów jak również ocenić istotność procesu katabolizmu, określoną na podstawie intensywności zmiany barwy (Pohland, Owen 2009). Płytki Biolog EcoPlates to 96-dółkowe mikro płytki, zawierające trzy powtórzenia 31 różnych substratów węglowych oraz wody, jako próby kontrolnej. W wyniku wykorzystania danego substratu przez wprowadzone do płytek mikroorganizmy, następuje zmiana barwy wskaźnika redox (fiolet tetrazoliowy), który ulega redukcji podczas utleniania substratów węglowych. Uzyskany w ten sposób profil metaboliczny obrazuje aktualny stan mikroorganizmów w danym środowisku.
5. **analizy fizykochemiczne** gleb (zawartość makro- i mikroelementów) oraz stabilność agregatów glebowych wykonano w Zakładzie Gleboznawstwa i Ochrony Gruntów IUNG-PIB.

2.5. Analizy statystyczne

W celu oszacowania istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test t-Studenta dla rozkładów normalnych, przyjęto poziom ufności 0,95. Wyliczono także wartości współczynnika korelacji prostej Pearsona dla $p < 0,05$ dla układów liniowych. Równania regresji przedstawiono na wykresach rozrzutu przy zastosowaniu testu R-kwadrat. Do analizy wyników zastosowano także jednoczynnikową i dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA. Ponadto w celu oceny korelacji wielu zmiennych wykonano analizę głównych składowych PCA. Na podstawie wyników uzyskanych z oznaczeń profilu metabolicznego (Biolog EcoPlates) dla każdej z prób glebowych wyliczono sumę absorbancji dla poszczególnych grup substratów (aminokwasów, polimerów, węglowodanów, amin, kwasów karboksylowych) a także wskaźnik bogactwa R (Richness), AWCD (well colour development) $> 0,25$ oraz wskaźnik różnorodności Shannon-Weaver (H). Wyniki analiz przedstawiono w postaci graficznej. Do statystycznej oceny wyników wykorzystano pakiet programów Statistica.pl (7), (Stat. Soft. Inc.).

3. CEL BADAŃ

Badania, które przeprowadzono w ramach niniejszego tematu miały na celu:

- a) poznanie zawartości glomalin, glikoprotein produkowanych przez grzyby mykoryzowe, w glebach Polski o różnej charakterystyce fizykochemicznej i reprezentującej zróżnicowany poziom intensywności rolnictwa z uwzględnieniem systemów uprawy roli i zabiegów agrotechnicznych.
- b) stwierdzenie, czy zabiegi agrotechniczne i systemy uprawy istotnie oddziałują na zawartość i gromadzenie się glomaliny w glebach i na populacje grzybów mykoryzowych, a tym samym na stabilność agregatów glebowych.

4. WYNIKI

4.1. Ocena zawartości glomalin w glebie spod pszenicy ozimej z uwzględnieniem systemów uprawy roli.

We współczesnym rolnictwie nowoczesna uprawa roli musi spełniać wiele warunków pozwalających na ochronę gleby i polepszanie jej parametrów. Przede wszystkim bardzo ważne jest ograniczenie strat glebowej materii organicznej oraz poprawę struktury gleby i zmniejszenie zlewności i skłonności jej do zaskorupiania się. Bardzo ważnym czynnikiem biologicznym w aspekcie omawianych problemów jest zawartość glomalin w glebie.

W latach 2015-2017 przeanalizowano poziom zawartości glomalin w próbkach glebowych pochodzących spod uprawy pszenicy ozimej odmiany Jantarka z uwzględnieniem różnych systemów uprawy roli (Tabela 4). Najwyższą zawartością glomalin ogólnych (TG), łatwoekstrahowalnych (EEG) oraz białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) charakteryzowała się gleba pobrana spod uprawy pszenicy ozimej odmiany Jantarka w systemie ekologicznym. Z kolei najniższe zawarości glomalin stwierdzono w glebie pobranej z systemu integrowanego. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej różnicy w zawarości glomalin w glebach pobranych z sytemu konwencjonalnego oraz integrowanego (Tabela 4).

Tabela 4. Stężenie glomalin oraz liczebność spor grzybów mykoryzowych w glebach z różnych systemów uprawy (średnia z lat 2015-2017).

System	Stężenie glomalin mg/g s. m. gleby			% kolonizacji	Liczebność spor grzybów AM o średnicy		
	GRSP	TG	EEG		50 µm	75 µm	150 µm
EKO	9.69 ^a	6.01 ^a	3.91 ^a	40.0 ^b	449.0 ^a	224.0 ^b	11.5 ^b
KON	9.02 ^b	5.10 ^b	3.69 ^b	41,4 ^b	374.5 ^b	213.5 ^b	10.5 ^b
INT	8.67 ^b	4.18 ^c	3.34 ^b	48.0 ^a	354.7 ^b	264.0 ^a	15.5 ^a
MON	8.40 ^c	5.42 ^b	2.97 ^c	36.5 ^c	240.7 ^c	198.5 ^c	9.0 ^c

Liczby oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między sobą (test Tukey'a, $P < 0,05$).

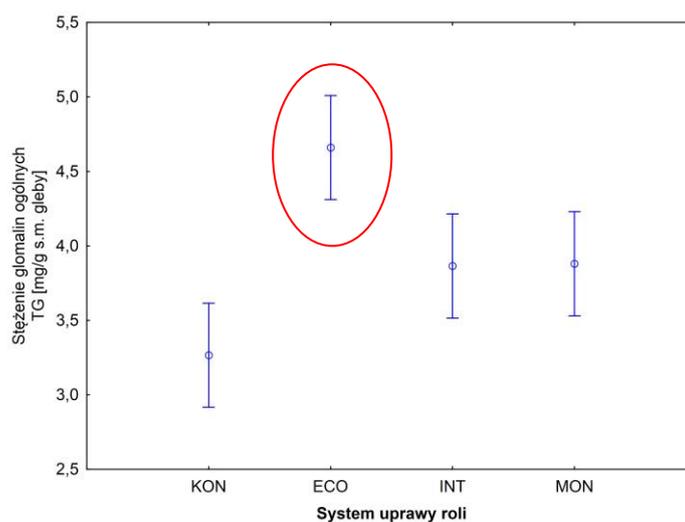
W tabeli 4 przedstawiono także liczebność spor grzybów mykoryzowych oraz procent kolonizacji korzeni pszenicy przez grzyby AM. Najwyższy procent kolonizacji grzybów AM stwierdzono w ryzosferze pszenicy uprawianej w systemie integrowanym (48,0%) a najniższy w monokulturze (36,5%). Z drugiej jednak strony najwyższą liczebność spor grzybów mykoryzowych o średnicy 50 µm stwierdzono w glebie pobranej spod uprawy pszenicy ozimej w systemie ekologicznym a najmniejszą w glebie spod uprawy w monokulturze.

Na rycinie 3 przedstawiono zawartość glomalin w glebie w zależności od zastosowanego systemu uprawy roli. Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA stwierdzono, iż zawartość glomalin ogólnych (TG) oraz białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) w systemie ekologicznym różniła się istotnie statystycznie od zawartości glomalin w innych systemach uprawy roli (Rys. 3). Natomiast w przypadku zawartości glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG) nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w ich zawartości

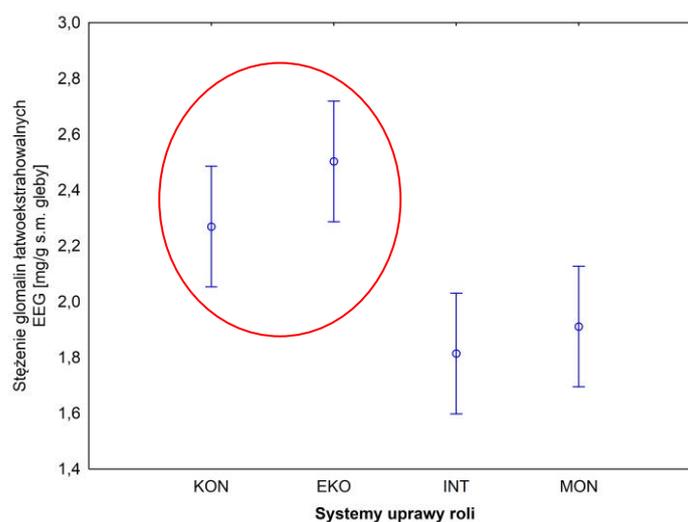
pomiędzy systemem konwencjonalnym a ekologicznym. Niemniej jednak zawartość glomalin EEG w systemie ekologicznym i konwencjonalnym była statystycznie istotnie wyższa od zawatości glomalin EEG w systemie integrowanym i monokulturze (Rys. 3).

Rys. 3. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA – zawartość glomalin w glebie w różnych systemach uprawy: a). stężenie glomalin ogólnych (TG); b). stężenie glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG); c). stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP).

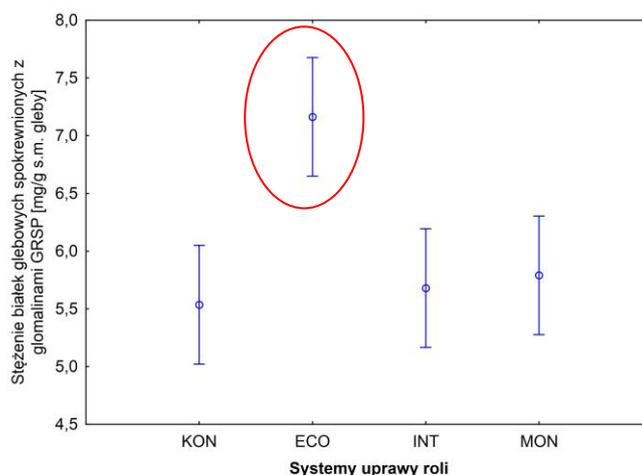
a).



b).



c).



Uprawa płużna charakteryzuje się największą ilością zabiegów uprawowych, wykonywane są one również najgłębiej (25-30 cm). W uprawie tej brak jest też ochrony wierzchniej warstwy gleby. Mimo stopniowego odchodzenia od tego systemu uprawy posiada on też szereg zalet. W uprawie płużnej długo utrzymuje się spulchnienie gleby, a resztki poźniwne można łatwo i dokładnie przykryć. Uprawa tego typu pozwala na dobre napowietrzenie gleby oraz wzrost jej aktywności biologicznej. Jedną z podstawowych wad systemu płużnego jest jego wysoka energochłonność. Ponadto w trakcie uprawy poprzez odwracanie gleby następuje naruszenie naturalnego układu gleby (niszczenie struktury gruzełkowej, przyspieszenie mineralizacji próchnicy). Odwracanie gleby powoduje wyciąganie na powierzchnię z dolnych warstw mikroorganizmów beztlenowych, a bakterie tlenowe podpowierzchniowe umieszcza się głęboko w profilu gleby. Doprowadzenie do poprzedniej równowagi życia biologicznego wymaga czasu. Działania te powodują również przesuszanie warstwy ornej i zmniejszenia nośności gleby.

Po zastosowaniu tradycyjnej uprawy następuje zwykle stymulacja aktywności mikrobiologicznej gleby, którą można wykazać na podstawie zwiększonej liczebności mikroorganizmów i wyższego tempa oddychania. Taka stymulacja jest rezultatem rozbicia agregatów glebowych, a więc wyeksponowania i natlenienia obecnych w nich substancji podatnych na degradację. Przeciwnie, użytkowanie bez zabiegów uprawowych wzmaga aktywność mikrobiologiczną jedynie przy lub też w pobliżu powierzchniowej warstwy gleby. Ponadto zabiegi uprawowe, jak również monokultury nie sprzyjają rozwojowi mezo- i makrofauny oraz grzybów mykoryzowych, co potwierdzono wynikami badań własnych. Uprawa rozrywa makroagregaty, a w nich stwierdza się najwyższe tempo mineralizacji. Orka powoduje rozrywanie oraz naruszenie struktury strzępek grzybowych, co znacznie opóźnia

infekcję roślin przez AMF. Z kolei kontynuowanie uprawy w monokulturze powoduje przeważnie znaczną obniżkę plonu. W tabeli 5 przedstawiono współczynniki korelacji prostej Pearsona wyliczone dla korelacji zawartości glomalin z podstawowymi parametrami oceny aktywności biologicznej gleby. Zawartość glomalin ogólnych TG korelowała silnie z aktywnością dehydrogenaz, zawartością węgla w biomacie mikroorganizmów oraz z materią organiczną (Tabela 5).

Tabela 5. Współczynniki korelacji prostej Pearson'a pomiędzy stężeniem glomalin a wybranymi parametrami aktywności biologicznej gleby (obliczenia dla średnich z lat 2016-2017).

Parameter	EEG	DHA	MBC	POM	OM
TG	0.894**	0.701**	0.683**	0.493*	0.862**
EEG	1	0.737**	0.807**	0.722**	0.947**
DHA		1	0.962**	0.732**	0.873**
MBC			1	0.824**	0.924**
POM				1	0.791**

** - istotne różnice przy P=0.01; *- istotne różnice przy P=0.05; objaśnienia: DHA – aktywność dehydrogenaz; MBD – zawartość węgla w biomacie mikroorganizmów; OM – zawartość materii organicznej

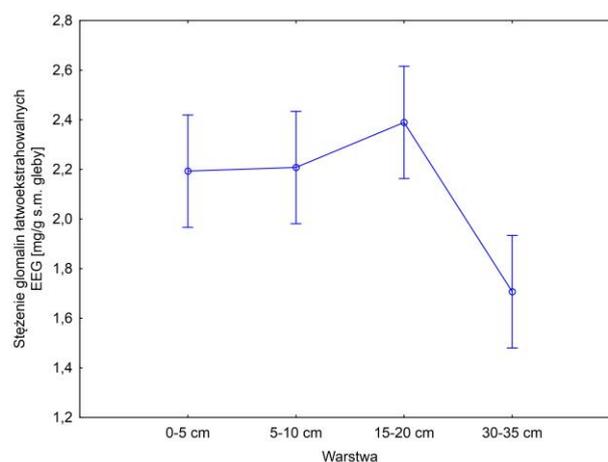
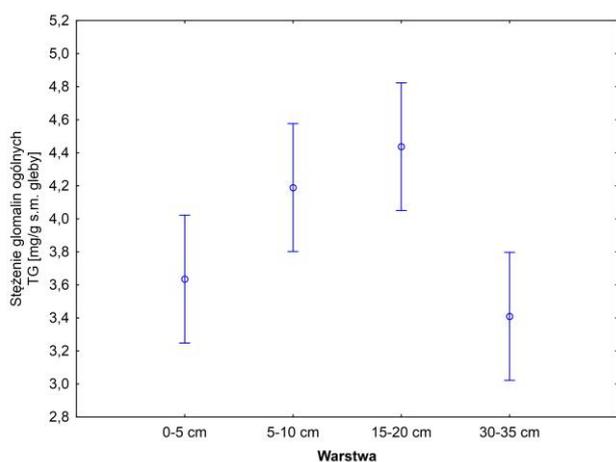
Ponadto uprawie roślin w monokulturze towarzyszy zwykle spadek żyzności i produktywności gleby, a tym samym plonowania roślin. Przyczyną tego zjawiska jest „zmęczenie gleby” spowodowane toksycznym działaniem substancji biologicznie czynnych i ich metabolitów oraz nagromadzeniem grzybów patogennych, eliminujących grzyby mykoryzowe. Badania przeprowadzone w Minnesocie (Wright, 2007) potwierdzają, 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.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż system ekologicznej uprawy okazał się najlepszym systemem wśród badanych do rozwoju grzybów AM i produkcji przez nie glomalin. Z kolei 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.

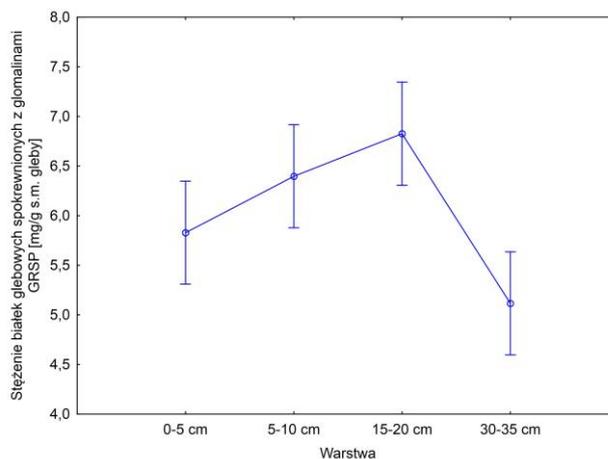
W przypadku oceny zawartości glomalin w glebie duże znaczenie ma także poziom poboru gleby. W celu określenia zależności zawartości glomalin w różnych poziomach gleby określono zawartość tych glikoprotein w określonych warstwach gleby: 0-5cm, 5-10cm, 10-15 cm, 15-20cm, 20-35 cm (Rys 4). Najwyższą zawartość glomalin stwierdzono w warstwach od 0-20 cm, natomiast najniższą w warstwie 30-35 cm. Wynika to głównie z zasięgu korzeni uprawianej rośliny (w tym przypadku pszenicy odmiej odmiany Jantarka) w głąb profilu glebowego.

Rys. 4. Zawartość glomalin w zależności od poziomu poboru próbek: a). stężenie glomalin ogólnych (TG); b). stężenie glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG); c). stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP).



a)

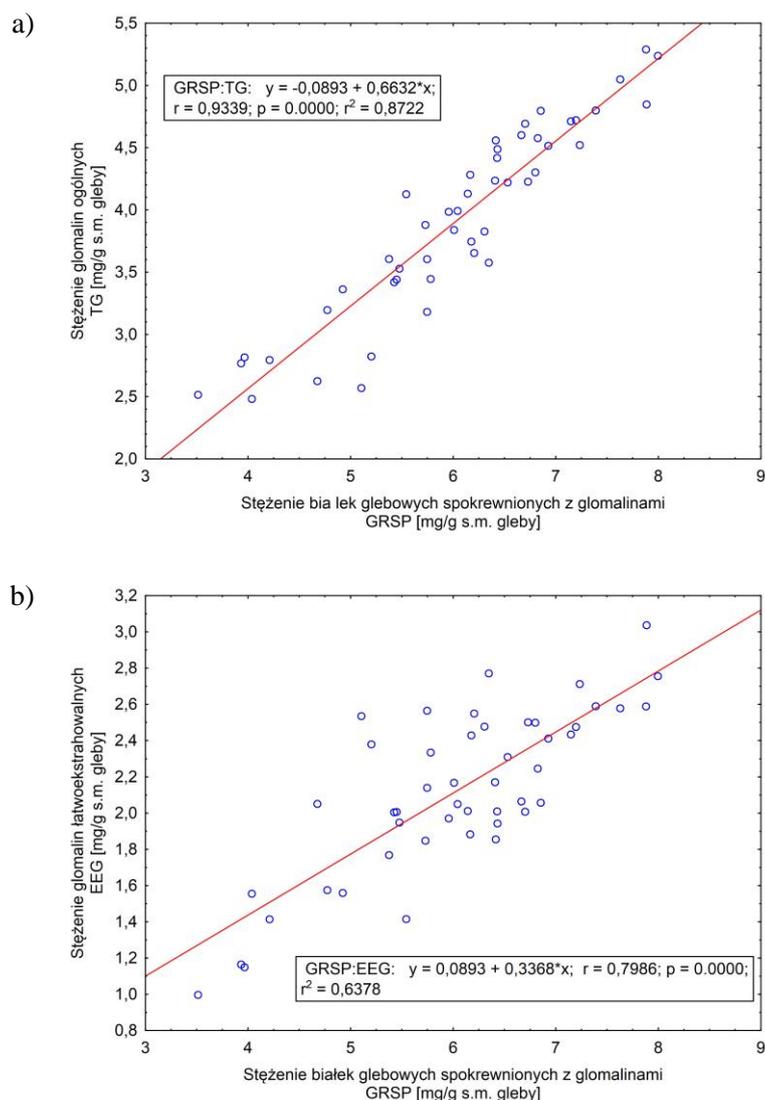
b)



c)

Ponadto stwierdzono silną korelację pomiędzy stężeniem białek TG a GRSP (Rys 5), natomiast zależność ta nie była już tak silna pomiędzy zawartością białek TG a EEG.

Rys. 5. Wykres zależności pomiędzy: a) stężeniem białek TG a GRSP; b) stężeniem białek EEG a GRSP.



Reasumując, 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 glebowych. Stąd też, stężenie otrzymanych glomalin w poszczególnych systemach uprawy odzwierciedla jedynie wpływ systemu na rozwój grzybów AMF i produkcję przez nie glomalin. Stąd też można stwierdzić, iż ilość wytwarzanych przez grzyby AM glomalin zależała istotnie m.in. od systemu uprawy. System ekologiczny znacznie podwyższał

produkcję glomalin i ich koncentrację w glebie w przeciwieństwie do integrowanego systemu uprawy i monokultury.

4.2. Ocena zawartości glomalin w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze z zastosowaniem różnych techniki przygotowania gleby do siewu

Badania dotyczące zawartości glomalin w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze z zastosowaniem różnych technik przygotowania gleby do siewu prowadzono w latach 2015-2017. Doświadczenie polowe, z którego pobierano próbki glebowe dotyczyło wieloletniej uprawy kukurydzy w monokulturze. Doświadczenie założone zostało w 2004 roku, w pasach z odbiciem lustrzanym i trwa do dzisiaj w RZD Grabów (woj. mazowieckie). Oznaczenia obejmowały 4 kombinacje glebowe:

- a) **Kn** - gleba spod monokultury kukurydzy nie orana (siew bezpośredni)
- b) **Ko** - gleba spod monokultury kukurydzy orano (pełna uprawa płużna)
- c) **Kz** - gleba spod monokultury kukurydzy oraną w zmianowaniu (jęczmień jary, pszenica ozima, kukurydza)
- d) **Ku** - gleba spod monokultury kukurydzy (uprawa uproszczona, gruber).

Próbki glebowe pobierano w trzech fazach wzrostu roślin: faza 6 liści, faza 12 liści, faza kwitnienia oraz przed siewem i po zbiorze kolb. Odmianą kukurydzy użytą w doświadczeniu była odmiana LG 3226. Zastosowane zostały następujące dawki nawozów: 140 kg N/ha, 28 kg P/ha, 104 kg K/ha. Doświadczenie przeprowadzono na glebie płowej, zaliczonej do kompleksu żytniego bardzo dobrego.

W obiekcie z pełną uprawą płużną, po zbiorze kolb słoma kukurydziana po rozdrobnieniu była jesienią przeorywana. W obiekcie bez uprawy mechanicznej rozdrobniona słoma pozostawała na powierzchni gleby. Jakość środowiska glebowego określono na podstawie oznaczeń aktywności biologicznej gleby poprzez określenie ogólnych liczebności bakterii i grzybów oraz aktywności enzymatycznej gleby (aktywność dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej i zasadowej). Określono także zawartość ogólnych (TG) i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (EE) w glebie oraz ich korelację z poszczególnymi parametrami aktywności biologicznej gleby.

Na podstawie analizy średnich zawartości glomalin w latach 2015-2017, najwyższą zawartość glomalin ogólnych stwierdzono w glebie w fazie kwitnienia kukurydzy (2.91 mg/g s.m. gleby), natomiast najniższą w glebie przed siewem (2,07 mg/g s.m. gleby) (Tabela 6). Również w przypadku zawartości glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG) oraz białek

glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) najwyższe ich zawartości stwierdzono w glebie pobranej spod uprawy kukurydzy w fazie kwitnienia.

Table 6. Zawartość glomalin w próbkach glebowych na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (średnia z lat 2015-2017).

Termin poboru próbek glebowych	TG	EEG	GRSP
	mg/g s.m. gleby		
przed siewem	2.07 ^b	1.10 ^a	3.17 ^a
faza 6 liści	2.80 ^a	1.32 ^{ab}	4.12 ^b
faza 12 liści	2.86 ^a	1.39 ^b	4.26 ^b
kwitnienie	2.91 ^a	1.41 ^b	4.32 ^b
po zbiorach	2.79 ^a	1.28 ^{ab}	4.07 ^b

Liczby oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między sobą (test Tukey'a, $P < 0,05$).

Grzyby mykoryzowe aktywnie rozwijają się w nienaruszonym systemie glebowym, bez zastosowania orki (siew bezpośredni) i mogą powodować: agregację gleby, zwiększenie penetracji wody, ochronę materii organicznej przed rozkładem oraz wzrost odporności gleb na erozję (Miller, Jastrow, 2000). Stąd też wysokie stężenie glomalin stwierdzono w niezakłóconym, systemie bezorkowym z zastosowaniem siewu bezpośredniego jako techniki przygotowania gleby do siewu. Jest to wynikiem formowania oraz utrzymywania trwałości agregatów glebowych.

W przeprowadzonych badaniach najniższe zawartości glomalin ogólnych stwierdzono w glebie spod uprawy kukurydzy z zastosowaniem pełnej uprawy płużnej (Tabela 7). W uprawie tej następuje rozbicie agregatów glebowych oraz inwazyjne rozerwanie filamentów grzybowych, stąd też zawartość glikoprotein produkowanych przez grzyby AM była niska. Z drugiej jednak strony, 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 (Mirás-Avalos i in., 2011). Bardziej wiarygodne w ocenie trwałości agregatów glebowych stają się więc GRSP lub EEG, których wartości mogą odzwierciedlać rzeczywistą zawartość glomalin w glebie (Wright, Upadhyaya, 1996). Niemniej jednak, w przypadku zawartości białek glebowych spokrewnionych z glomalinami także w przypadku pełnej uprawy płużnej obserwowano najmniejszą ich zawartość (Tabela 7). Tłumaczyć to można także tym, iż, jak wykazały

wcześniejsze badania, glomaliny ogólne charakteryzuje znacznie mniejsza immunoreaktywność w porównaniu do łatwoekstrahowalnych glomalin oraz białek GRSP wykazujących znacznie wyższą immunoreaktywność (Wright, Upadhyaya, 1999). Ponadto wysokie wartości stężeń białek GRSP wskazuje, że te frakcje glomalin mogą w jednoznaczny sposób tłumaczyć związek pomiędzy zawartością glomalin a zastosowanymi praktykami rolniczymi (Wright i in., 1998; Gillespie i in., 2011).

Tabela 7. Zawartość glomalin w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze i zmianowaniu na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (średnia z lat 2015-2017).

Termin	Technika przygotowania gleby	TG	EEG	GRSP
		mg/g s.m. gleby		
przed siewem	siew bezpośredni	2.87 ^{bcd}	1.12 ^{ab}	3.99 ^{abcd}
	uprawa uproszczona	2.00 ^{ab}	1.25 ^{abc}	3.25 ^a
	pełna uprawa płużna	1.89 ^a	1.35 ^{abc}	3.24 ^a
	zmianowanie	3.01 ^{cde}	1.11 ^a	4.12 ^{abcd}
faza 6 liści	siew bezpośredni	3.53 ^{de}	1.59 ^c	5.12 ^f
	uprawa uproszczona	3.54 ^{de}	1.39 ^{abc}	4.93 ^{def}
	pełna uprawa płużna	2.78 ^{abcd}	1.22 ^{abc}	4.00 ^{abcd}
	zmianowanie	2.85 ^{abcd}	1.18 ^{abc}	4.03 ^{abcd}
faza 12 liści	siew bezpośredni	3.03 ^{cde}	1.57 ^{bc}	4.59 ^{cdef}
	uprawa uproszczona	3.24 ^{cde}	1.15 ^{abc}	4.39 ^{bcde}
	pełna uprawa płużna	2.75 ^{abcd}	1.12 ^{ab}	3.87 ^{abc}
	zmianowanie	2.74 ^{abcd}	1.23 ^{abc}	3.97 ^{abcd}
kwitnienie	siew bezpośredni	3.34 ^{cde}	1.27 ^{abc}	4.61 ^{cdef}
	uprawa uproszczona	3.19 ^{cde}	1.24 ^{abc}	4.43 ^{bcde}
	pełna uprawa płużna	2.82 ^{abcd}	1.30 ^{abc}	4.11 ^{abcd}
	zmianowanie	2.91 ^{bcde}	1.24 ^{abc}	4.15 ^{abcd}
po zbiorach	siew bezpośredni	3.51 ^{de}	1.47 ^{abc}	4.98 ^{def}
	uprawa uproszczona	3.85 ^e	1.17 ^{abc}	5.02 ^{ef}
	pełna uprawa płużna	2.98 ^{cde}	1.14 ^{abc}	4.12 ^{abcd}
	zmianowanie	2.38 ^{abc}	1.08 ^a	3.46 ^{ab}

Liczby oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie między sobą (test Tukey'a, $P < 0,05$).

W tabeli 8 przedstawiono liczebność spor grzybów mykoryzowych oraz procent kolonizacji korzeni przez grzyby AM w glebie w długoletniej monokulturze kukurydzy. Najwyższą liczebność grzybów AM stwierdzono w glebie pobranej spod uprawy kukurydzy w systemie siewu bezpośredniego (Tabela 8). Ponadto liczebność spor grzybów AM o

średnicy 50-74 μm była silnie skorelowana zarówno z zawartością glomalin ogólnych (TG), jak i glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG) (Tabela 8).

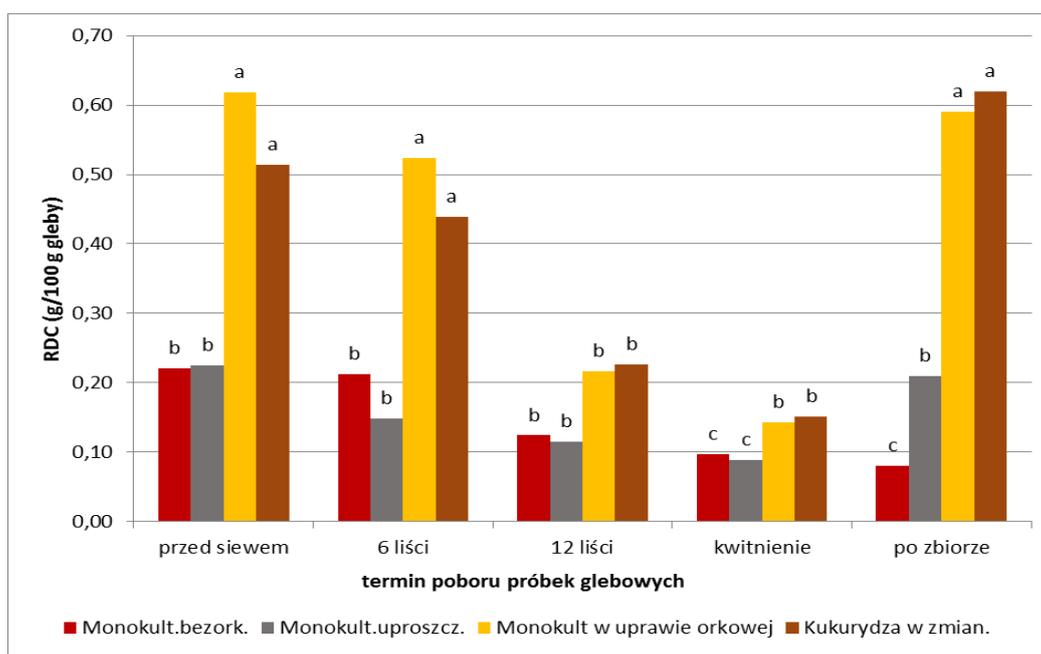
Tabela 8. Liczebność spor oraz procent kolonizacji grzybów mykoryzowych w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze i zminowaniu.

Nr	Liczebność spor 50-74 μm (%)	Liczebność spor 75-149 μm (%)	Liczebność spor > 150 μm (%)	r_{TG} liczebność spor 50-74 μm	r_{EEG} liczebność spor 50-74 μm
Kn	506 (53%)	365 (38%)	81 (9%)	0,865	0,615
Ku	485 (54%)	359 (40%)	57 (6%)	0,725	0,778
Ko	244 (49%)	217 (44%)	36 (7%)	0,815	0,642
Kz	231 (50%)	199 (43%)	31 (7%)	0,878	0,822

Z danych literaturowych wynika, iż zawartość glomalin w glebie jest silnie skorelowana ze stabilnością agregatów glebowych (Wright i in., 1998).

W analizowanych próbkach glebowych określono zatem stabilność agregatów glebowych jako zawartość łatwo dyspergowanego iłu RDC (readily dispersible clay) w g/100 g gleby (Rys. 6). W przypadku monokultury bezorkowej z zastosowaniem siewu bezpośredniego oraz w monokulturze uproszczonej stwierdzono najwyższą stabilność agregatów glebowych a tym samym najmniejszą podatność gleb na destrukcję (RDC w przedziale 0,21-0,3 oraz RDC <0,2). Ponadto zarówno zawartość białek TG, EEG jak i GRSR wykazywała silne korelacje z zawartością łatwo dyspergowanego iłu (RDC) (Tabela 9).

Rys 6. Stabilność agregatów glebowych.



Objaśnienie:

Klasy podatności gleb na destrukcję; RDC (g/100g):

- I gleby bardzo silnie podatne >0,50
- II gleby silnie podatne 0,41-0,50
- III gleby podatne 0,31-0,40
- IV gleby słabo podatne 0,21-0,30
- V gleby bardzo słabo podatne < 0,20

Tabela 9. Współczynniki korelacji prostej Pearsona ($P \leq 0.05$).

Nr	r_{TG}	r_{EEG}	r_{GRSP}
Kn	0,814	0,752	0,912
Ku	0,722	0,625	0,742
Ko	0,521	0,486	0,556
Kz	0,547	0,612	0,741

W tabeli 10 przedstawiono współczynniki korelacji prostej Pearsona pomiędzy zawartością glomalin ogólnych, łatwoekstrahowalnych oraz białek glebowych spokrewnionych z glomalinaми a podstawowymi parametrami chemicznymi gleby oraz aktywnością biologiczną gleb. Silne korelacje wykazano pomiędzy ogólną zawartością glomalin a aktywnością enzymatyczną: dehydrogenaz ($r=0,859$), fosfatazy alkalicznej ($r=0,712$) (tabela 10). Ponadto w przypadku ogólnej zawartości glomalin łatwoekstrahowalnych stwierdzono silną korelację pomiędzy EEG a ogólną liczebnością bakterii ($r=0,960$) oraz ogólną liczebnością grzybów ($r=0,998$).

Tabela 10. Współczynniki korelacji prostej Pearsona.

Parametr	C _{org}	P _{Egner}	K _{Egner}	Mg	TG	EEG	GRSP	DHA	AcP	AIP	Bakterie	Grzyby	MBC
pH	-0.809*	0.538	0.087	-0.093	0.353	-0.236	0.249	-0.060	0.423	-0.324	-0.043	-0.272	0.575
C _{org}		-0.674*	-0.527	-0.096	-0.835*	-0.222	-0.767*	-0.496	-0.032	-0.266	-0.296	-0.211	-0.008
P _{Egner}			0.823*	-0.635	0.599	-0.339	0.436	0.619	0.558	-0.033	-0.405	-0.310	0.184
K _{Egner}				-0.377	0.782*	0.104	0.694*	0.947*	0.088	0.480	-0.082	0.155	-0.393
Mg					0.201	0.866*	0.370	-0.081	-0.894*	0.578	0.954*	0.833*	-0.523
TG						0.545	0.981*	0.859*	-0.314	0.712*	0.477	0.563	-0.513
EEG							0.696*	0.413	-0.965*	0.908*	0.960*	0.998*	-0.853*
GRSP								0.831*	-0.489	0.818*	0.628	0.711*	-0.634
DHA									-0.238	0.737*	0.215	0.461	-0.658
AIP										-0.832	-0.923*	-0.961*	0.842*
AcP											0.768*	0.933*	-0.960*
Bakterie (B)												0.939*	-0.673*
Grzyby (F)													-0.885*

* wartości istotne statystycznie ($P \leq 0.05$), (n=9, średnie z lat 2015-2017).

Legenda:

C_{org} [g/kg gleby]

P_{Egner}, K_{Egner}, Mg [mg/kg gleby]

Ogólna liczebność bakterii (B) [10^8 jtk/g s.m. gleby]

Ogólna liczebność grzybów (F) [10^4 jtk/g s.m. gleby]

Aktywność dehydrogenaz (DHA) [ug formazan/g s.m. gleby/24h]

Aktywność fosfatazy zasadowej (AIP) [ug p-nitrophenol/g s.m. gleby/h]

Aktywność fosfatazy kwaśnej (AcP) [ug p-nitrophenol/g s.m. gleby/h]

Biomasa C (MBC) [ug/g s.m. gleby]

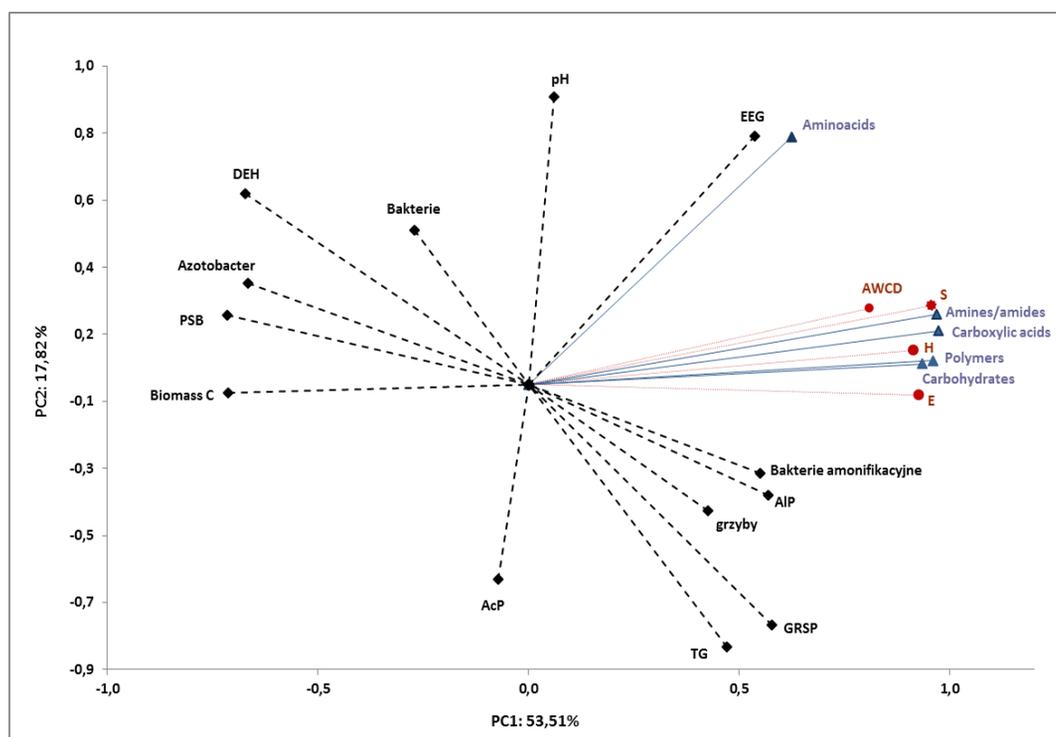
Glomaliny ogólne (TG) [mg/g s.m. gleby]

Glomaliny łatwoekstrahowalne (EEG) [mg/g s.m. gleby]

Białka glebowe spokrewnione z glomalinami (GRSP) [mg/g s.m. gleby]

Na podstawie analizy głównych składowych PCA wykazano, iż badane parametry aktywności biologicznej gleby wyjaśniają zmienność glebową w blisko 71,33% (Rys. 7). Zawartość glomalin była silnie skorelowana z ogólną liczebnością grzybów, aktywnością fosfatazy kwaśnej oraz zasadowej.

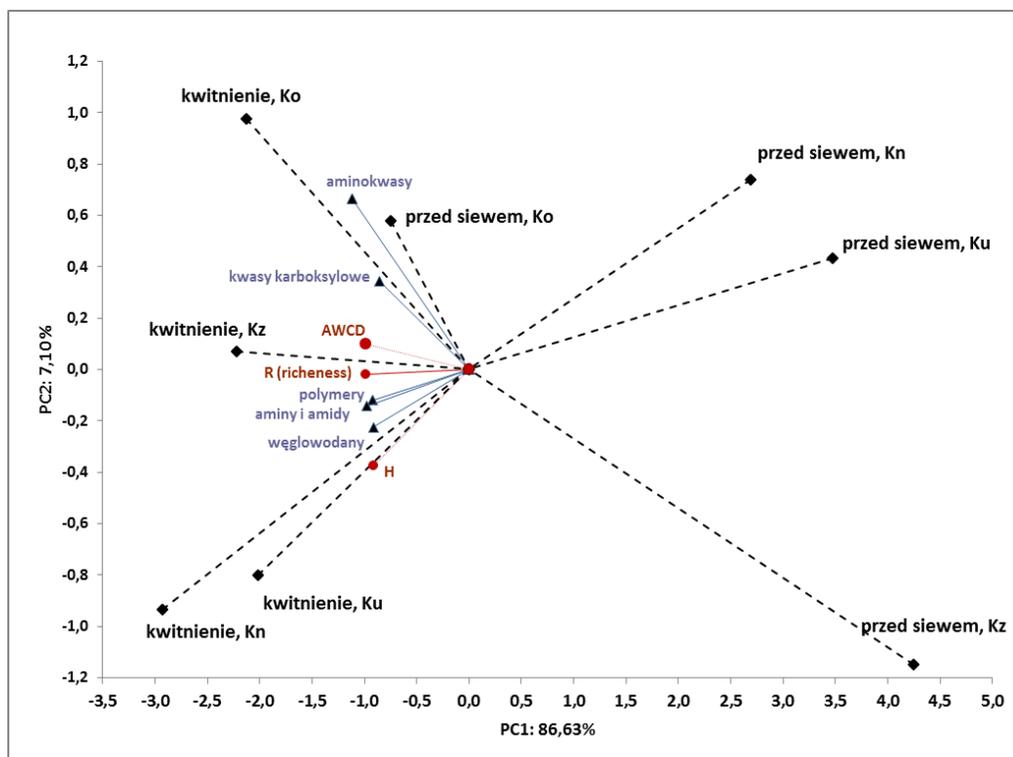
Rys. 7. Analiza głównych składowych (PCA) przyjmując za zmienne poszczególne parametry aktywności biologicznej gleb.



Ponadto, analizując jako zmienne podstawowe parametry bioróżnorodności gleb obliczone na podstawie wyników uzyskanych z oceny profilu metabolicznego po 120h inkubacji płytek Biolog EcoPlates stwierdzono, iż najwyższymi parametrami aktywności biologicznej charakteryzowała się gleba pobrana w fazie kwitnienia kukurydzy (Rys. 8). Gleba pobrana przed siewem charakteryzowała się natomiast statystycznie niższą aktywnością biologiczną, z wyjątkiem gleby pobranej przed siewem z zastosowaniem pełnej uprawy pląznej (Ko) (Rys. 8).

Ponadto gleby pobrane spod uprawy kukurydzy w fazie kwitnienia z zastosowaniem siewu bezpośredniego (Kn) i uproszczeń (Ku) stanowiły odmienną grupę pod względem oceny aktywności biologicznej w porównaniu do gleb pobranych w fazie kwitnienia kukurydzy z zastosowaniem pełnej uprawy pląznej (Ko) oraz zmianowania (Kz) (Rys. 8).

Rys. 8. Analiza głównych składowych (PCA). W analizie przyjęto za zmienne poszczególne parametry bioróżnorodności gleb obliczone po 120h inkubacji płytek Biolog EcoPlates: sumę absorbancji dla poszczególnych grup substratów (aminokwasów, polimerów, węglowodanów, amin, kwasów karboksylowych) a także wskaźnik bogactwa R (Richness), AWCD (well colour development) oraz wskaźnik różnorodności Shannon-Weaver (H).



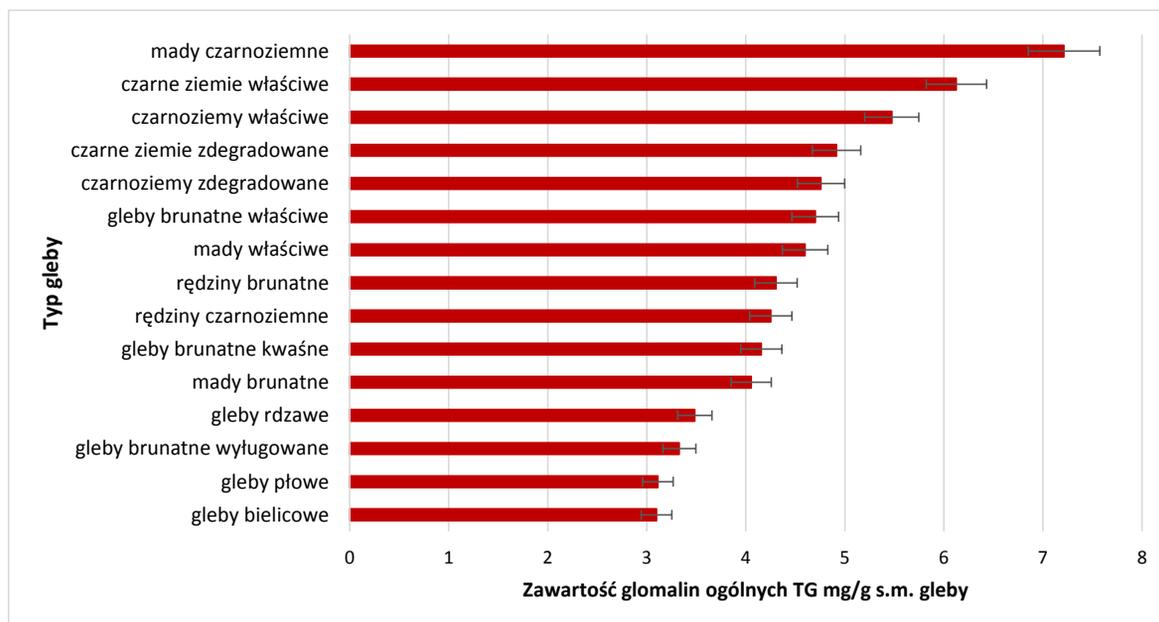
4.3. Ocena zawartości glomalin w reprezentatywnych glebach pochodzących z krajowego monitoringu gleb ornych Polski

Prawidłową strukturę gleby oraz jej żyzność warunkuje wzmożona aktywność biologiczna. Wszelkie zmiany właściwości gleby mogą przyczynić się do zmian liczebności i aktywności organizmów glebowych zarówno zmian w ich składzie gatunkowym jak i funkcjonalnym. Stąd też celem tej części badań było określenie zawartości glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnej jako wskaźnika jakości gleb użytkowanych rolniczo na przykładzie reprezentatywnych gleb Polski.

Materiał glebowy stanowiły próbki glebowe pochodzące z krajowego monitoringu chemizmu gleb ornych pobrane w roku 2015 przez pracowników Zakładu Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów IUNG-PIB. Próbkę (216 próbek glebowych) do analiz laboratoryjnych były pobierane z głębokości 0-20 cm i powierzchni ok. 100 m², a następnie mieszane w celu uzyskania próbki średniej. Każda próbka posiadała odpowiednią dokumentację terenową (www.gios.gov.pl).

Na podstawie oznaczeń stężenia glomalin ogólnych w zależności od typu gleby najwyższe stężenie tego białka stwierdzono w madach czarnoziemnych, czarnoziemach właściwych oraz czarnych ziemiach właściwych (Rys. 9).

Rys. 9. Zawartość glomalin ogólnych w zależności od typu gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).



Test HSD Tukeya; zmienna TG, Grupy jednorodne, alfa = ,05000; Błąd: MS międzygrupowe = 3,5286, df = 216,00

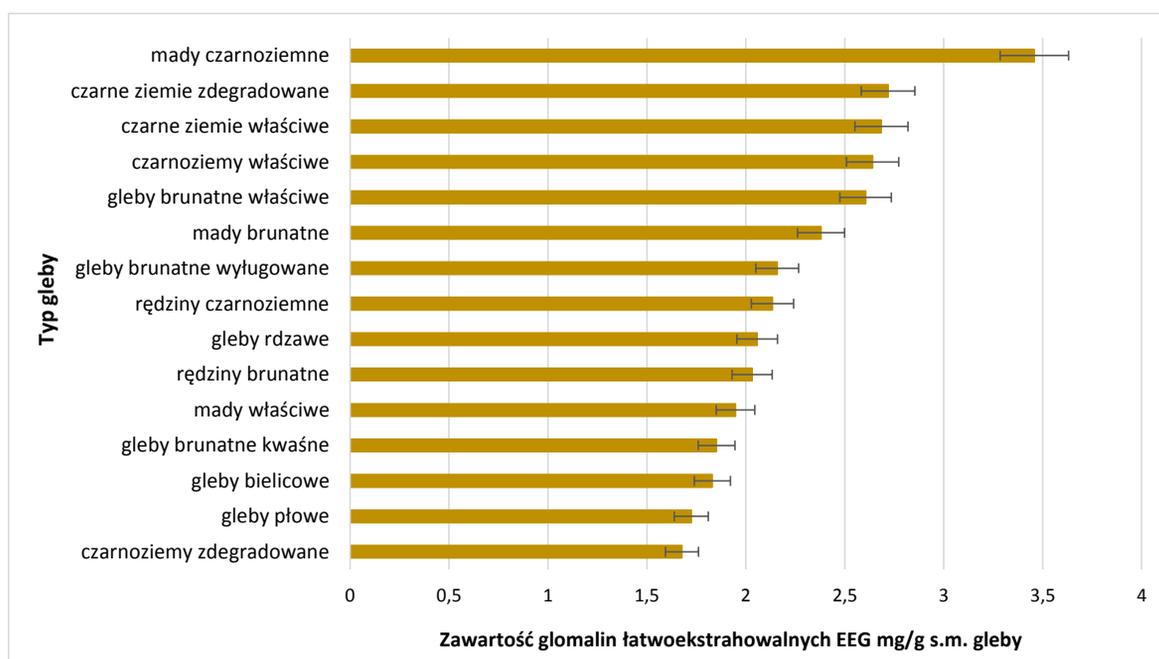
Typ gleby_ skrót	TG; Średnie	1	2
A	3,398529	****	****
AP	3,412233	****	****
C	3,547474		****
Bw	3,864259	****	****
Ar	3,985279	****	****
Fb	4,055104	****	
Bk	4,155551	****	
Gc	4,252255	****	
Gb	4,304894	****	
F	4,598403	****	
B	4,695575	****	
Cz	4,759599	****	
Dz	4,915475	****	
D	6,094544		****
Fc	7,213445		****

Te trzy typy gleb zaliczyć można do jednej grupy pod względem zawartości glomalin TG w glebie. Kolejną grupę pod względem zawartości glomalin ogólnych stanowiły następujące typy gleb: czarne ziemie zdegradowane, czarnoziemny zdegradowane, gleby brunatne właściwe, mady właściwe, rędziny brunatne, rędziny

czarnoziemne, gleby brunatne kwaśne oraz mady brunatne. Trzecią grupę gleb charakteryzujących się najniższym stężeniem glomalin ogólnych stanowiły: gleby rdzawe, gleby brunatne wylugowane, gleby płowe oraz gleby bielcowe (Rys. 9).

Ocenę zawartości glomalin łatwoekstrahowalnych w różnych typach gleb Polski przedstawiono na wykresie 10. Glebami o najwyższym stężeniu białek EEG były typy: mady czarnoziemne, czarne ziemie zdegradowane, czarne ziemie właściwe, czarnoziemy właściwe i mady brunatne.

Rys. 10. Zawartość glomalin łatwoekstrahowalnych w zależności od typu gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).

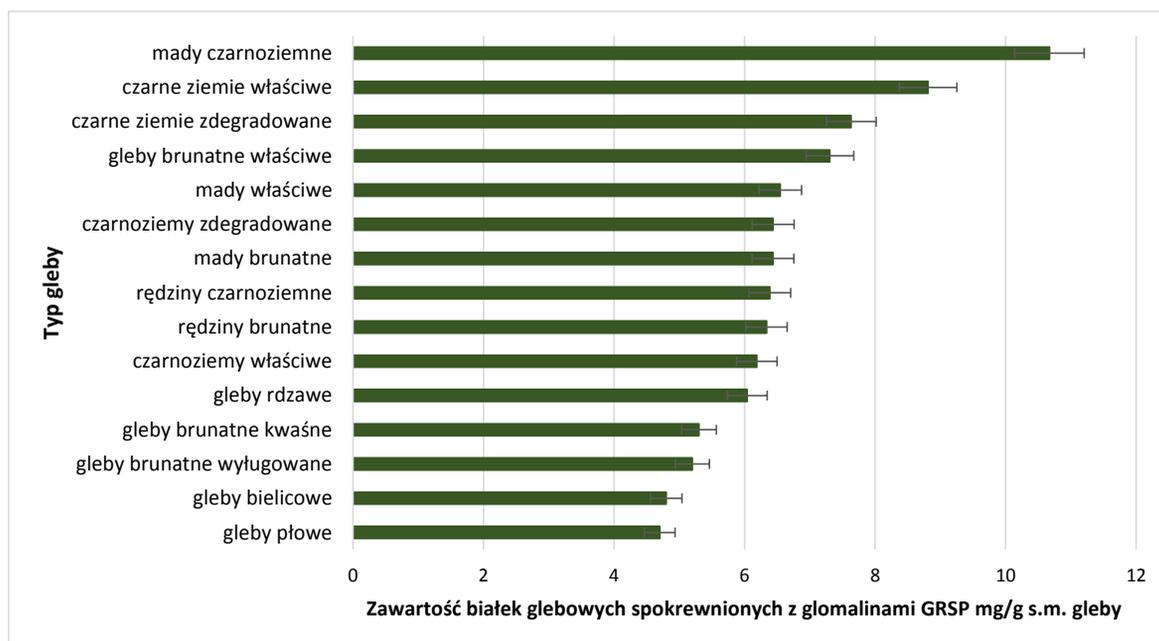


Test HSD Tukeya; zmienna EEG; Grupy jednorodne, alfa = ,05000 Błąd: MS międzygrupowe = ,48275, df = 216,00				
Typ gleby_skrót	EEG Średnie	1	2	3
Cz	1,677436	****		****
AP	1,724325	****		****
A	1,830930	****		****
Bk	1,851915	****		****
F	1,947742	****		
Gb	2,032182	****		
Ar	2,057215	****	****	
Gc	2,135282	****	****	
Bw	2,195958		****	
Fb	2,379892	****	****	****
B	2,633118	****	****	****
C	2,640615	****	****	****
D	2,668725	****	****	****

Dz	2,718839	****	****	****
Fc	3,458241	****	****	****

Podobnie jak w przypadku glomalin ogólnych najwyższe stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami GRSP stwierdzono w następujących typach gleb: madach czarnoziemnych, czarnoziemach właściwych, czarnych ziemiach zdegradowanych oraz glebach brunatnych właściwych (Rys. 11).

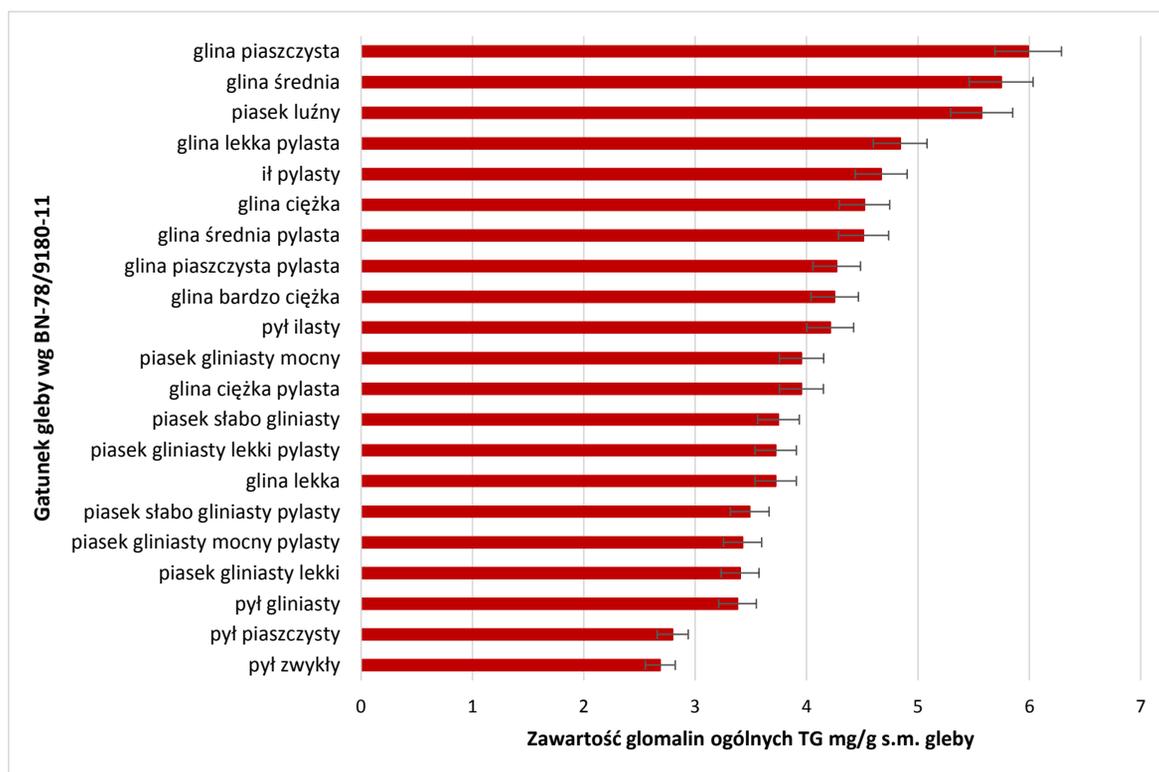
Rys. 11. Zawartość białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w w zależności od typu gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).



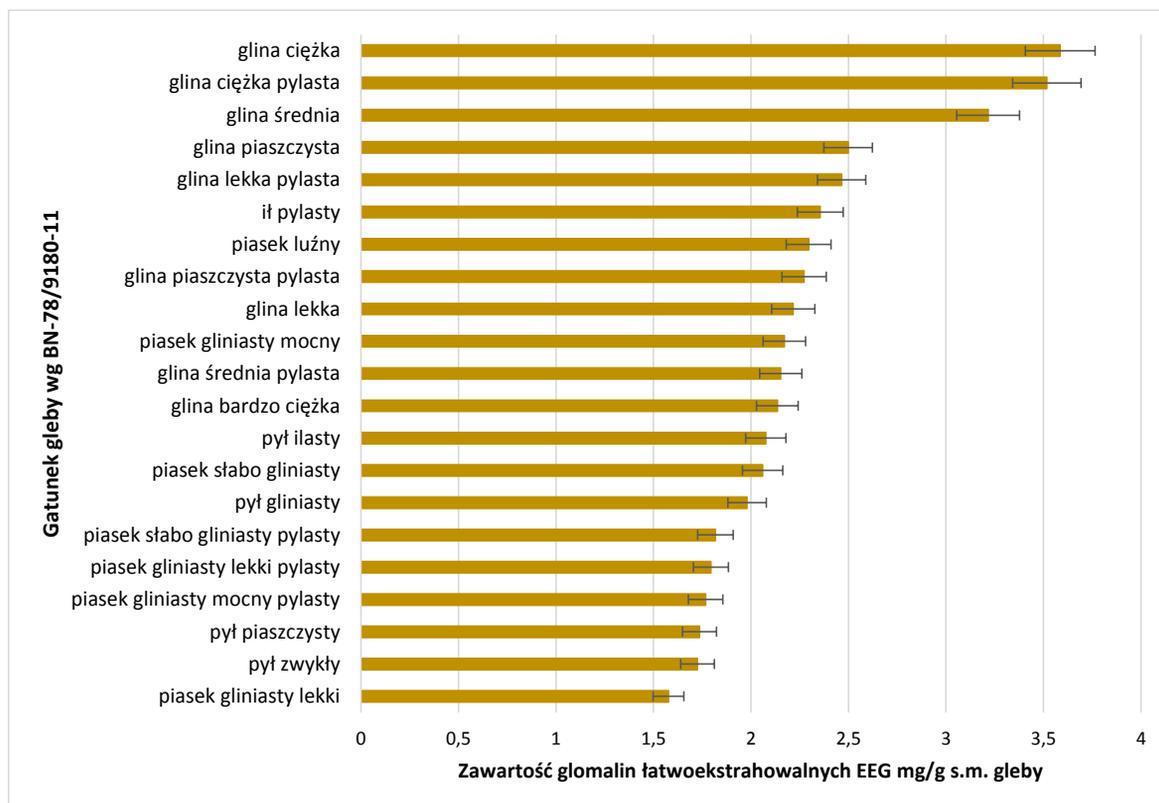
Test HSD Tukeya; zmienna GRSP; Grupy jednorodne, alfa = ,05000 Błąd: MS międzygrupowe = 5,6626, df = 216,00				
Typ gleby_skrót	GRSP Średnie	1	2	3
AP	5,13656	****		
A	5,22946	****	****	
Bk	6,00747	****	****	
Ar	6,04249	****	****	
Bw	6,06022	****	****	
C	6,18809			****
Gb	6,33708	****	****	****
Gc	6,38754	****	****	****
Fb	6,43500	****	****	****
Cz	6,43703	****	****	****
F	6,54615	****	****	****
B	7,32869			****
Dz	7,63431	****	****	****
D	8,76327			****
Fc	10,67169			****

Analizując zawartość glomalin na przykładzie reprezentatywnych gleb pochodzących z krajowego monitoringu gleb uprawnych Polski posłużono się także klasyfikacją gleb do gatunku na podstawie normy branżowej BN-78/9180-11. Stężenia glomalin w glebie na przykładzie klasyfikacji gleb do gatunku przedstawiono na wykresach 12-14.

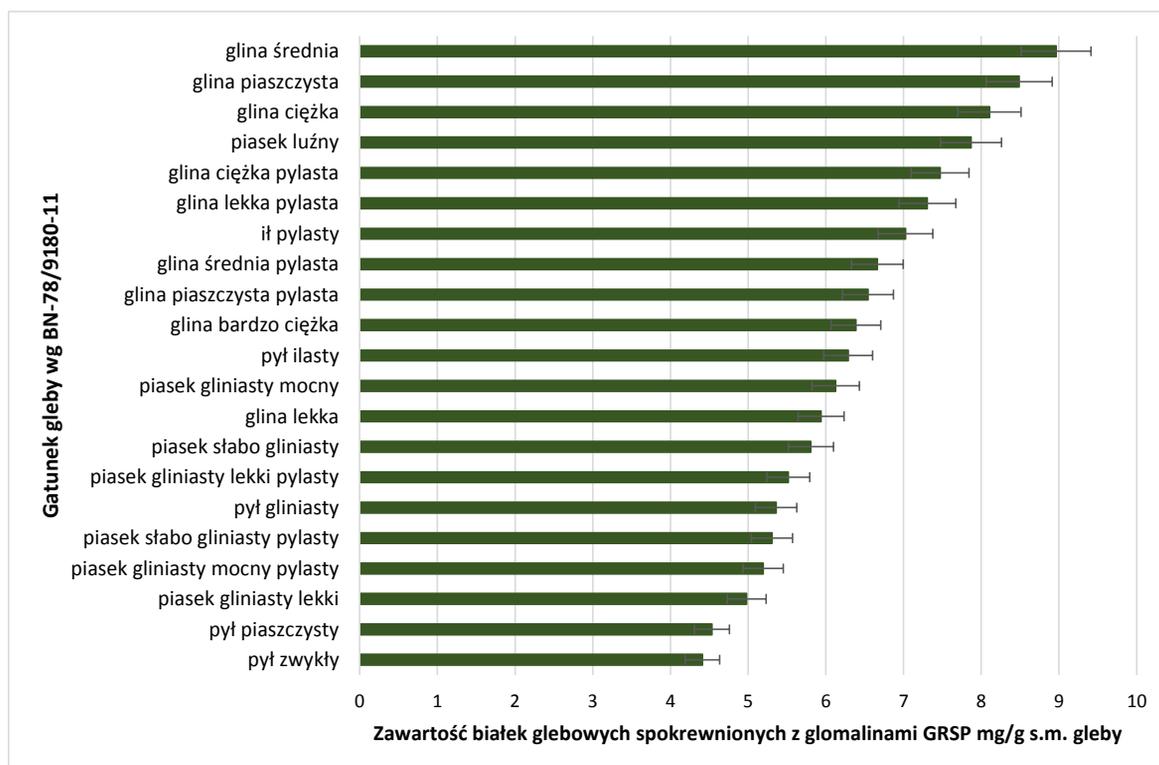
Rys. 12. Zawartość glomalin ogólnych w zależności od gatunku gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).



Rys. 13. Zawartość glomalin łatwoekstrahowalnych w zależności od gatunku gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).

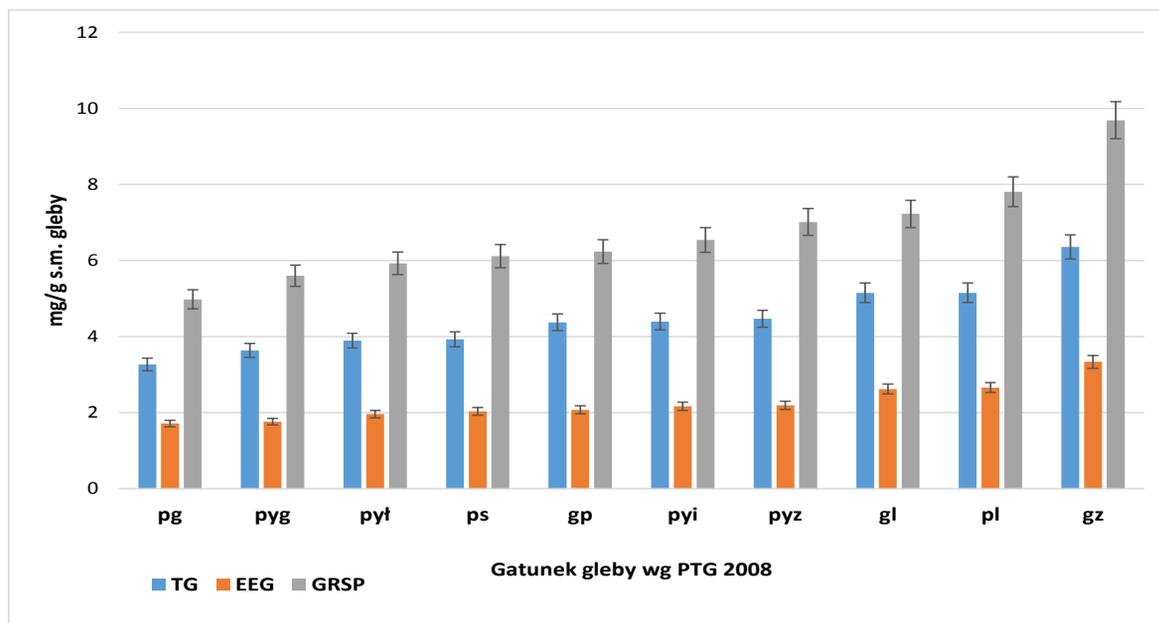


Rys. 14. Zawartość białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w zależności od gatunku gleby obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n = 216$).



Stężenie glomalin na przykładzie klasyfikacji gleb do gatunku według PTG 2008 przedstawiono na wykresie 15.

Rys. 15. Stężenie glomalin w zależności od gatunku gleby wg PTG 2008 obliczona na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$; $n=216$).



Objaśnienia:

pl	piasek luźny	gpyi	glina pylasto-ilasta
ps	piasek słabogliniasty	pyg	pył gliniasty
pg	piasek gliniasty	pyz	pył zwykły
gp	glina piaszczysta	pyi	pył ilasty
gl	glina lekka	ip	ił piaszczysty
gpi	glina piaszczysto-ilasta	ipy	ił pylasty
gz	glina zwykła	iz	ił zwykły
gi	glina ilasta	ic	ił ciężki

Na podstawie tabeli 11 przedstawiającej współczynniki korelacji prostej Pearsona stwierdzono, iż stężenie glomalin w glebie silnie korelowało z takimi parametrami właściwości gleb jak: C_{org} , N_{org} , zawartość Ca^{2+} oraz Mg^{2+} oraz stężeniem magnezu przyswajalnego.

Tabela 11. Współczynniki korelacji prostej Pearsona (n=216).

	pH _{H2O}	próchnica	C _{org}	N _{org}	TG	EEG	GRSP	Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	P	K	Mg
					stężenie glomalin			kationy wymienne						formy przyswajalne	
pH _{H2O}	1,000	0,021	0,137	0,119	0,070	0,215	0,119	0,796	0,476	0,195	0,202	0,282	0,376	0,332	0,383
próchnica	0,021	1,000	0,194	0,819	0,026	0,121	0,056	-0,035	0,007	0,001	-0,006	0,015	-0,003	0,010	0,020
C _{org}	0,137	0,194	1,000	0,654	0,430	0,466	0,472	0,114	0,288	0,100	0,275	0,274	0,015	0,313	0,467
N _{org}	0,119	0,819	0,654	1,000	0,230	0,355	0,285	0,060	0,178	0,071	0,172	0,204	0,021	0,230	0,322
TG	0,070	0,026	0,430	0,230	1,000	0,671	0,975	0,070	0,142	0,360	0,120	0,115	0,030	0,099	0,210
EEG	0,215	0,121	0,466	0,355	0,671	1,000	0,819	0,192	0,220	0,272	0,220	0,197	0,063	0,175	0,329
GRSP	0,119	0,056	0,472	0,285	0,975	0,819	1,000	0,112	0,176	0,360	0,159	0,148	0,042	0,129	0,261
Al	0,796	-0,035	0,114	0,060	0,070	0,192	0,112	1,000	0,380	0,189	0,178	0,212	0,451	0,336	0,295
Ca ²⁺	0,476	0,007	0,288	0,178	0,142	0,220	0,176	0,380	1,000	0,203	0,202	0,195	0,211	0,238	0,276
Mg ²⁺	0,195	0,001	0,100	0,071	0,360	0,272	0,360	0,189	0,203	1,000	0,119	0,043	0,068	0,403	0,154
Na ⁺	0,202	-0,006	0,275	0,172	0,120	0,220	0,159	0,178	0,202	0,119	1,000	0,237	0,077	0,364	0,329
K ⁺	0,282	0,015	0,274	0,204	0,115	0,197	0,148	0,212	0,195	0,043	0,237	1,000	-0,044	0,176	0,743
P	0,376	-0,003	0,015	0,021	0,030	0,063	0,042	0,451	0,211	0,068	0,077	-0,044	1,000	0,343	0,025
K	0,332	0,010	0,313	0,230	0,099	0,175	0,129	0,336	0,238	0,403	0,364	0,176	0,343	1,000	0,385
Mg	0,383	0,020	0,467	0,322	0,210	0,329	0,261	0,295	0,276	0,154	0,329	0,743	0,025	0,385	1,000

* kolorem czerwonym zaznaczono wartości istotne statystycznie ($P \leq 0.05$), (n=216).

Legenda:

Próchnica, C_{org} [%]

Kationy wymienne: Al, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, [cmol(+) kg⁻¹]

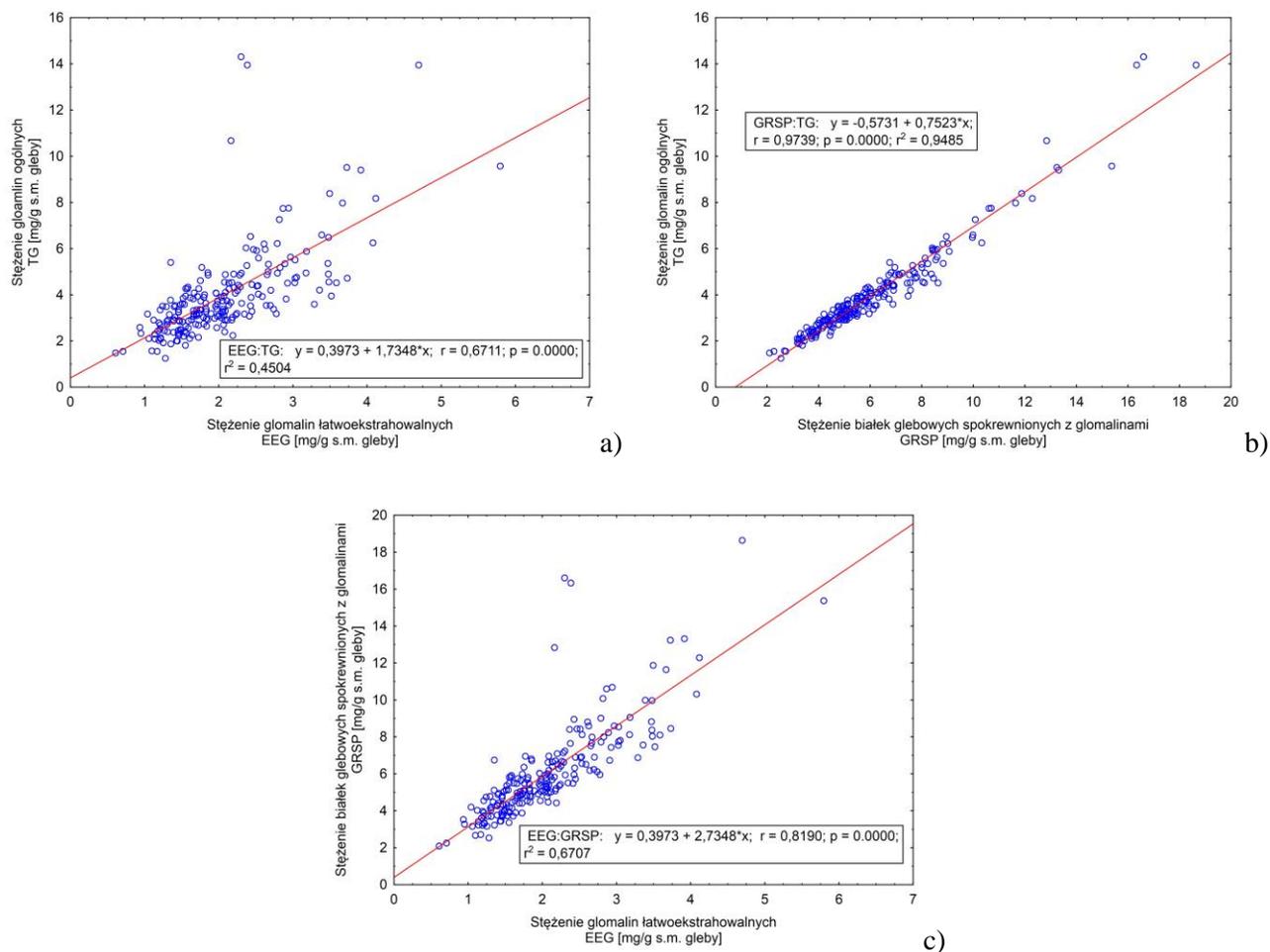
Formy przyswajalne fosforu, potasu i magnezu: P [P₂O₅·100g⁻¹]; K [K₂O·100g⁻¹]; Mg [Mg·100g⁻¹]

Glomaliny ogólne (TG) [mg·g⁻¹s.m. gleby]

Glomaliny łatwoekstrahowalne (EEG) [mg·g⁻¹ s.m. gleby]

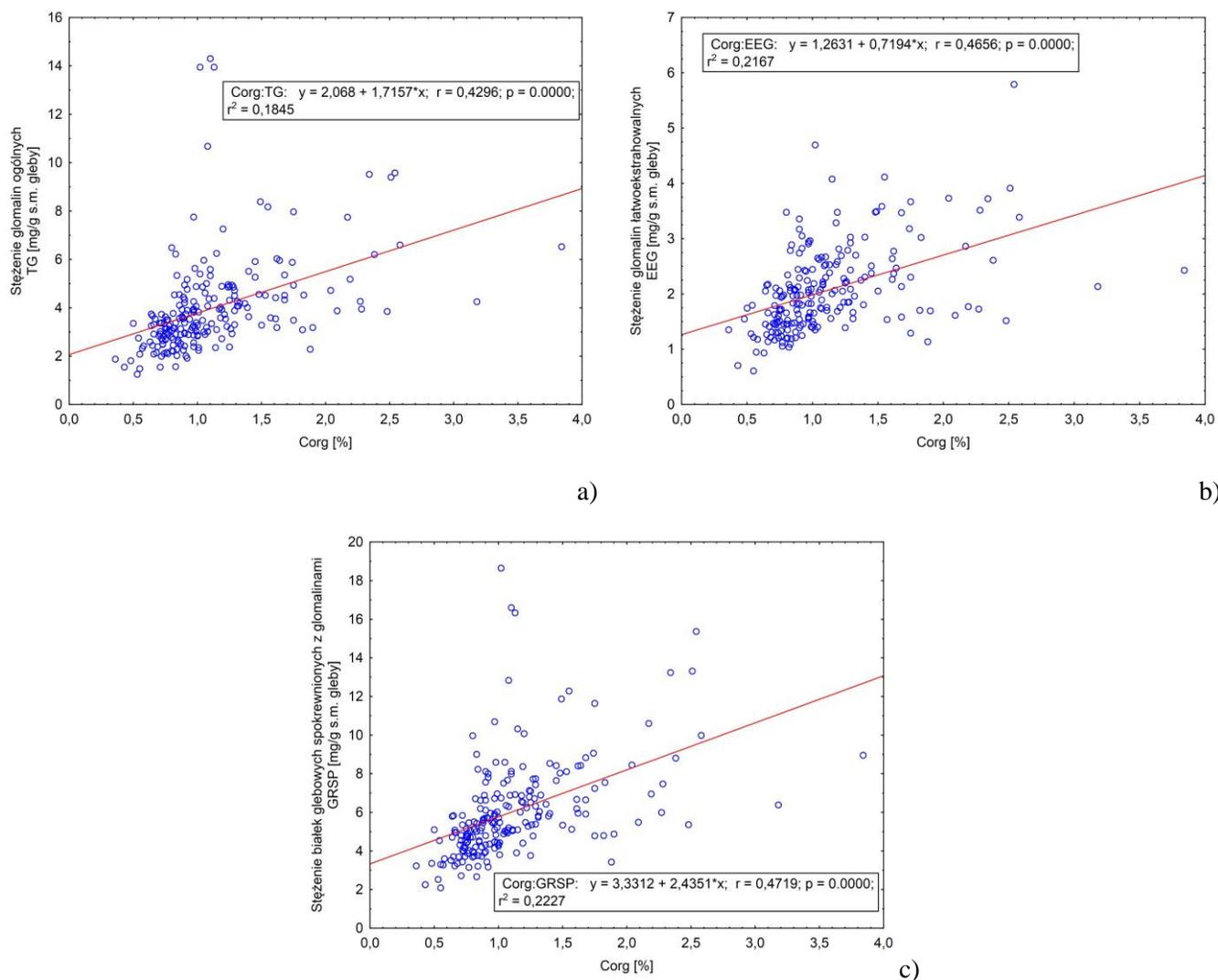
Białka glebowe spokrewnione z glomalinami (GRSP) [mg·g⁻¹ s.m. gleby]

Rys. 16. Wykres zależności pomiędzy: a) stężeniem białek TG a EEG; b) stężeniem białek TG a GRSP; c). stężeniem białek EEG a GRSP (n=216).



Na przykładzie analizy 216 próbek glebowych na zawartość glomalin ogólnych, łatwoekstrahowalnych oraz białek glebowych spokrewnionych z glomalinami wykazano, iż powyższe glikoproteiny glebowe były silnie ze sobą skorelowane. Najsilniejsze korelacje stwierdzono pomiędzy ogólną zawartością białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) a stężeniem glomalin ogólnych (TG) ($r=0,948$) (wykres 16). Ponadto silne korelacje określono także pomiędzy zawartością glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG) a stężeniem białek GRSP ($r=0,819$). Tak silnych korelacji nie stwierdzono natomiast pomiędzy stężeniem glomalin a zawartością węgla organicznego (wykres 17). Korelacje te wynosiły odpowiednio: dla białek TG ($r=0,429$), dla białek EEG ($r=0,465$) oraz dla białek glebowych spokrewnionych z glomalinami GRSP ($r=0,471$).

Rys. 17. Wykres zależności pomiędzy: a) stężeniem białek TG a C_{org} ; b) stężeniem białek EEG a C_{org} ; c). stężeniem białek GRSP a C_{org} (n=216).



Przeprowadzone w niniejszej części badania wykazały, iż ilość wytwarzanych przez grzyby AMF glomalin zależała m. in. od typu gleby oraz korelowała z ogólną zawartością węgla ogólnego i azotu w glebie. Otrzymane wyniki badań potwierdzają przyjętą hipotezę, że zawartość glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych może być miarodajnym wskaźnikiem oceny jakości gleb użytkowanych rolniczo.

4.4. Ocena zawartości glomalin oraz aktywności biologicznej w reprezentatywnych glebach pochodzących z krajowego monitoringu gleb ornych Polski na przykładzie gleb pochodzących z województwa lubelskiego.

W celu przedstawienia pełniejszej analizy oraz korelacji zawartości glomalin w glebie z parametrami aktywności biologicznej gleb do analizy wybrano gleby pochodzące z

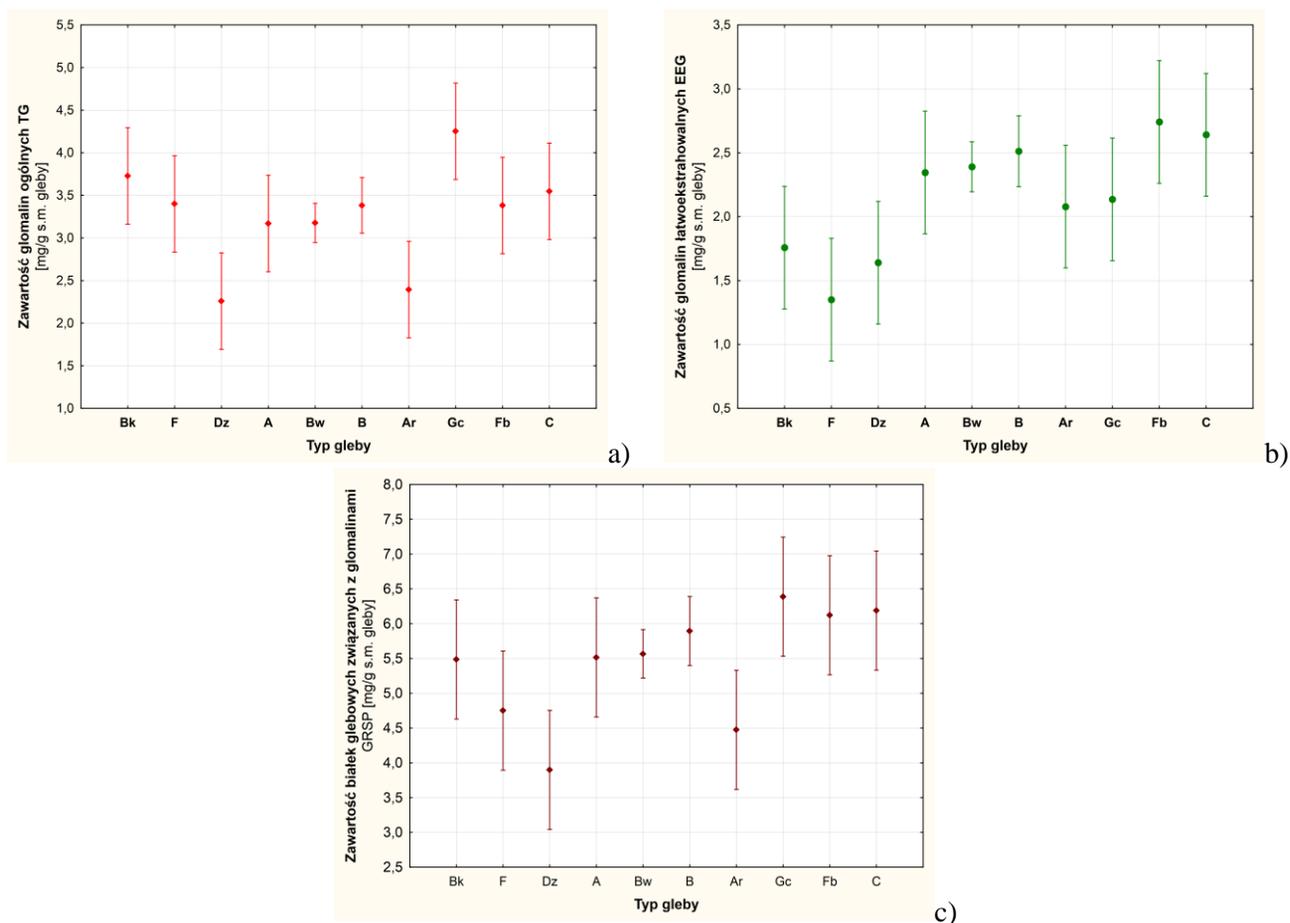
krajowego monitoringu gleb ornych Polski na przykładzie gleb pochodzących z województwa lubelskiego. W tabeli 12 przedstawiono zawartość glomalin w reprezentatywnych glebach pochodzących z województwa lubelskiego.

Tabela 12. Stężenie glomalin w próbkach glebowych pochodzących z województwa lubelskiego (n=3).

Nr	Typ gleby	TG	EEG	GRSP
		mg/g s.m. gleby		
1	gleby brunatne kwaśne	3,72	1,75	5,48
2	mady właściwe	5,40	1,35	6,75
3	gleby płowe	2,29	1,46	3,75
4	czarne ziemie zdegradowane	2,25	1,63	3,89
5	gleby bielcowe	3,16	2,34	5,51
6	gleby brunatne wylugowane	3,59	3,28	6,88
7	gleby brunatne właściwe	3,54	2,69	6,23
8	gleby brunatne wylugowane	2,90	2,11	5,02
9	gleby rdzawe	2,39	2,07	4,47
10	gleby brunatne wylugowane	3,18	2,77	5,96
11	gleby brunatne kwaśne	2,44	1,26	3,71
12	gleby płowe	4,93	2,79	7,73
13	gleby brunatne wylugowane	3,19	2,24	5,44
14	rędziny czarnoziemne	4,25	2,13	6,38
15	gleby brunatne wylugowane	2,90	2,08	4,98
16	gleby brunatne właściwe	3,52	2,42	5,95
17	gleby brunatne wylugowane	3,27	1,83	5,10
18	gleby brunatne właściwe	3,07	2,41	5,48
19	mady brunatne	3,38	2,74	6,12
20	czarnoziemy właściwe	3,54	2,64	6,18

Stężenie glomalin w próbkach glebowych pochodzących z województwa lubelskiego (20 próbek glebowych) oceniono zarówno dla różnych typów gleb (wykres 18), jak i różnych gatunków gleb: na przykładzie gatunków wg normy branżowej (wykres 19) jak i według PTG 2008 (wykres 20).

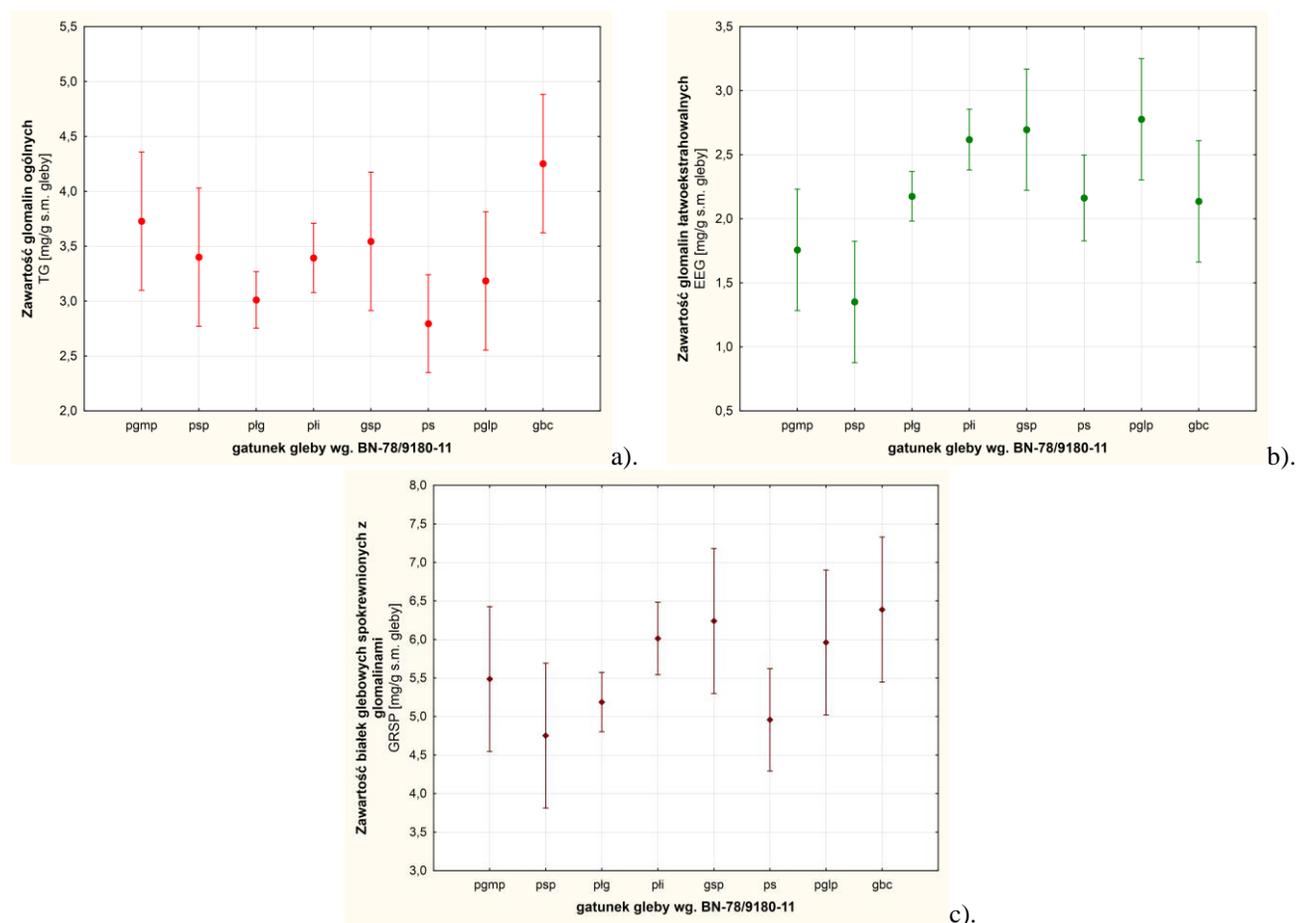
Rys. 18. Stężenie glomalin w zależności od typu gleby na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$): a) stężenie glomalin ogólnych (TG); b). stężenie glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG); c) stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP).



Objaśnienia:

A	gleby bielcowe	Cz	czarnoziemy zdegradowane
Ar	gleby rdzawe	D	czarne ziemie właściwe
AP	gleby płowe	Dz	czarne ziemie zdegradowane
B	gleby brunatne właściwe	F	mady właściwe
Bw	gleby brunatne wylugowane	Fc	mady czarnoziemne
Bk	gleby brunatne kwaśne	Fb	mady brunatne
C	czarnoziemy właściwe	Gc	rędziny czarnoziemne
		Gb	rędziny brunatne

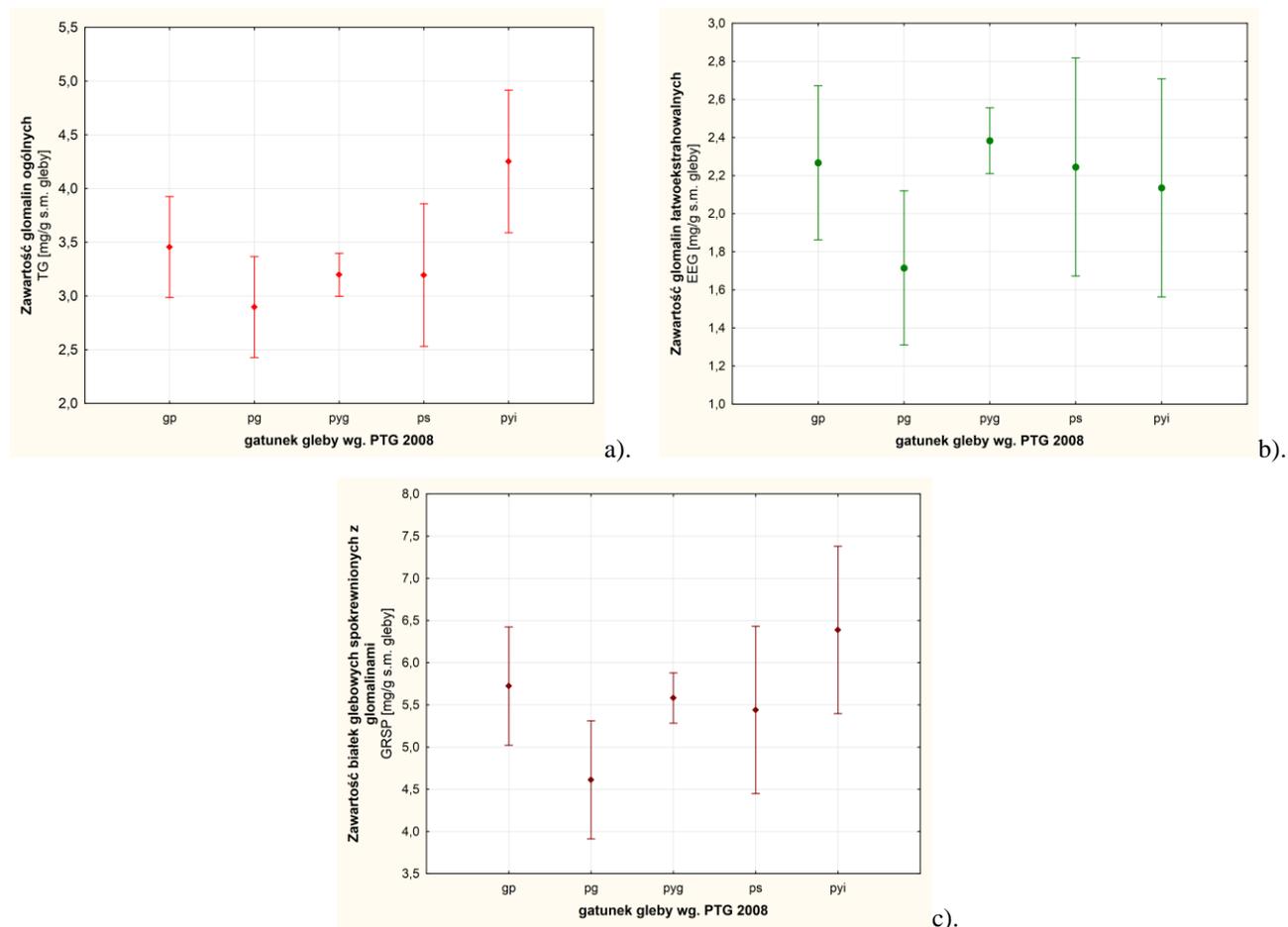
Rys. 19. Stężenie glomalin w zależności od gatunku gleby na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$): a) stężenie glomalin ogólnych (TG); b) stężenie glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG); c) stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP).



Objaśnienia:

pl	piasek luźny	gl	glina lekka
plp	piasek luźny pylasty	glp	glina lekka pylasta
ps	piasek słabo gliniasty	gs	glina średnia
psp	piasek słabo gliniasty pylasty	gsp	glina średnia pylasta
pgl	piasek gliniasty lekki	gc	glina ciężka
pglp	piasek gliniasty lekki pylasty	gcp	glina ciężka pylasta
pgm	piasek gliniasty mocny	gbc	glina bardzo ciężka
pgmp	piasek gliniasty mocny pylasty	ip	ił pylasty
gp	glina piaszczysta	i	ił
gpp	glina piaszczysta pylasta	plp	pył piaszczysty
		plz	pył zwykły
		plg	pył gliniasty
		pli	pył ilasty

Rys. 20. Stężenie glomalin w zależności od gatunku gleby na podstawie analizy wariancji ANOVA (test HSD Tukeya $P < 0,05$): a) stężenie glomalin ogólnych (TG); b). stężenie glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG); c) stężenie białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP).



Objaśnienia:

pl	piasek luźny	gpyi	glina pylasto-ilasta
ps	piasek słabogliniasty	pyg	pył gliniasty
pg	piasek gliniasty	pyz	pył zwykły
gp	glina piaszczysta	pyi	pył ilasty
gl	glina lekka	ip	ił piaszczysty
gpi	glina piaszczysto-ilasta	ipy	ił pylasty
gz	glina zwykła	iz	ił zwykły
gi	glina ilasta	ic	ił ciężki

Korelacje pomiędzy stężeniem glomalin a wybranymi parametrami aktywności biologicznej gleb przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Współczynniki korelacji prostej Pearsona dla gleb pobranych z województwa lubelskiego.

Zmienna	C _{org}	N _{org}	DEH	FK	FZ	B	G	Azo	MBC	MBN	TG	EEG	GRSP
C_{org}	1,000	0,674	0,633	0,185	0,588	0,547	-0,107	-0,131	0,865	0,811	0,370	0,699	0,790
N_{org}	0,674	1,000	0,063	0,134	-0,043	-0,132	-0,216	-0,129	0,186	0,221	0,029	0,798	0,607
DEH	0,633	0,063	1,000	0,323	0,677	0,645	0,039	0,553	0,877	0,879	0,173	0,820	0,601
FK	0,185	0,134	0,323	1,000	-0,353	-0,188	0,274	-0,166	0,213	0,252	0,499	-0,158	0,349
FZ	0,588	-0,043	0,677	-0,353	1,000	0,722	-0,191	0,466	0,712	0,685	-0,028	-0,177	-0,133
Bakterie	0,547	-0,132	0,645	-0,188	0,722	1,000	0,206	0,402	0,672	0,618	0,185	-0,167	0,064
Grzyby	-0,107	-0,216	0,039	0,274	-0,191	0,206	1,000	-0,136	-0,034	-0,183	0,632	0,796	0,824
Azo	-0,131	-0,129	0,553	-0,166	0,466	0,402	-0,136	1,000	0,097	0,168	-0,383	-0,251	-0,494
MBC	0,865	0,186	0,877	0,213	0,712	0,672	-0,034	0,097	1,000	0,962	0,301	0,661	0,171
MBN	0,811	0,221	0,879	0,252	0,685	0,618	-0,183	0,168	0,962	1,000	0,174	-0,132	0,075
TG	0,370	0,029	0,173	0,499	-0,028	0,185	0,632	-0,383	0,301	0,174	1,000	-0,153	0,800
EEG	0,099	0,298	-0,420	-0,158	-0,177	-0,167	-0,396	-0,251	-0,161	-0,132	-0,153	1,000	0,471
GRSP	0,390	0,207	-0,101	0,349	-0,133	0,064	0,324	-0,494	0,171	0,075	0,800	0,471	1,000

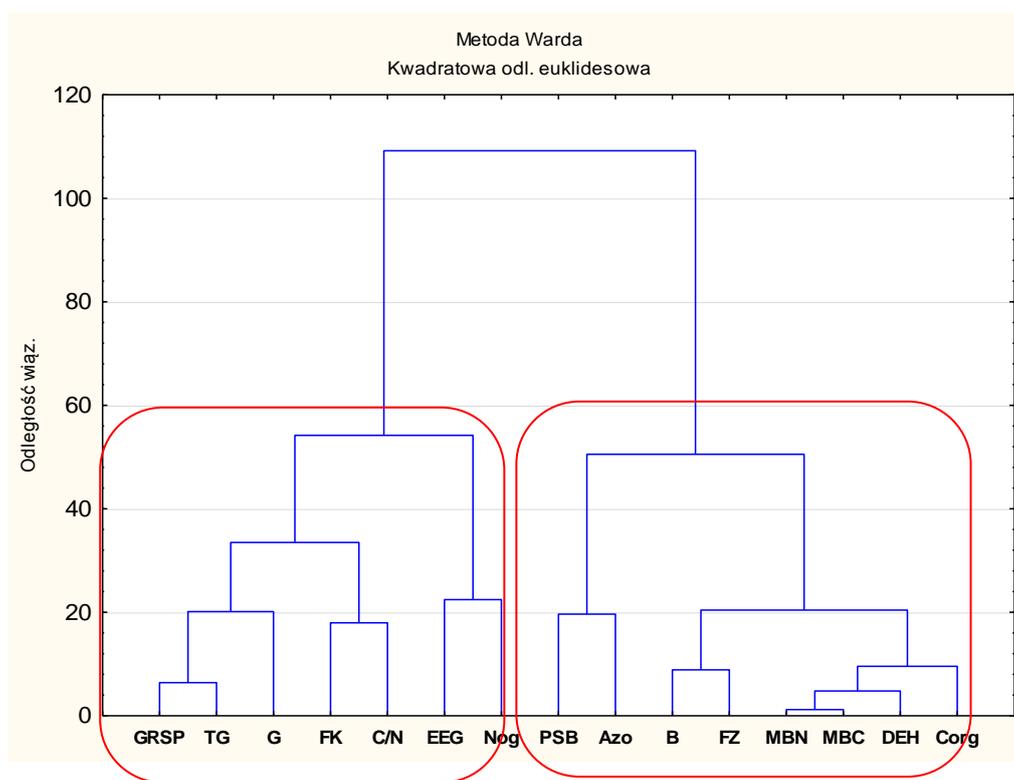
* kolorem czerwonym zaznaczono wartości istotne statystycznie ($P \leq 0.05$), (n=20).

Legenda:

- Ogólna liczebność bakterii (B) [10^8 jtk/g s.m. gleby]
- Ogólna liczebność grzybów (F) [10^4 jtk/g s.m. gleby]
- Ogólna liczebność Azotobaktera (Azo) [10^1 jtk/g s.m. gleby]
- Aktywność dehydrogenaz (DHA) [ug formazan/g s.m. gleby/24h]
- Aktywność fosfatazy zasadowej (AIP) [ug p-nitrophenol/g s.m. gleby/h]
- Aktywność fosfatazy kwaśnej (AcP) [ug p-nitrophenol/g s.m. gleby/h]
- Biomasa C (MBC); biomasa N (MBN) [ug/g s.m. gleby]
- Glomaliny ogólne (TG) [mg/g s.m. gleby]
- Glomaliny łatwoekstrahowalne (EEG) [mg/g s.m. gleby]
- Białka glebowe spokrewnione z glomalinami (GRSP) [mg/g s.m. gleby]

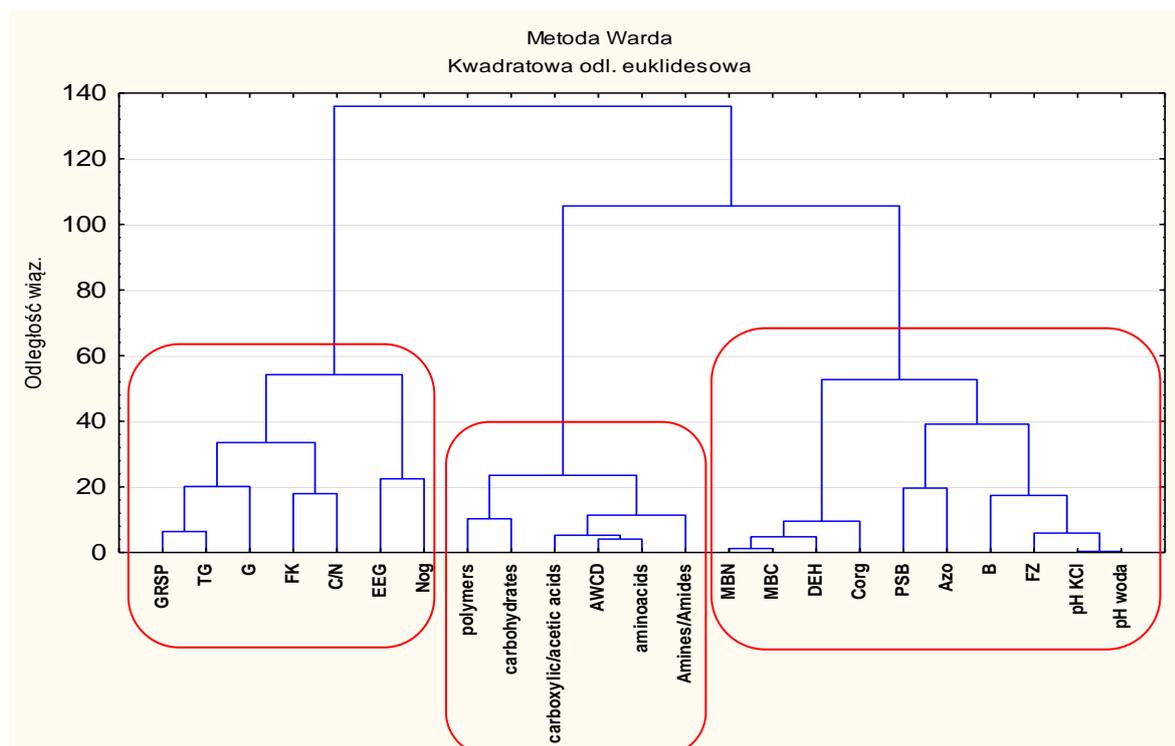
Na podstawie analizy skupień metodą Warda sklasyfikowano wybrane parametry aktywności biologicznej gleby na poszczególne grupy (Rys. 21). Na podstawie kryterium Sneath's'a (odcięcie przy 66%) wybrane parametry podzielono na dwie główne grupy. W pierwszej grupie znalazły się parametry związane z aktywnością biologiczną grzybów: stężenie TG, EEG, GRSP, aktywność fosfatazy kwaśnej (FZ), stosunek C/N, ogólna liczebność grzybów (G), zawartość azotu organicznego (N_{org}). Natomiast w drugiej grupie znalazły się parametry związane z aktywnością biologiczną oraz funkcjonalną bakterii tj.: ogólna liczebność bakterii (B), bakterii rozpuszczających fosforany (PSB), liczebność *Azotobacteria* (Azo), aktywność fosfatazy zasadowej (FZ) oraz dehydrogenaz (DEH), zawartość węgla (MBC) i azotu (MBN) w biomacie mikroorganizmów oraz zawartość węgla organicznego (C_{org}).

Rys. 21. Analiza skupień – metoda Warda.



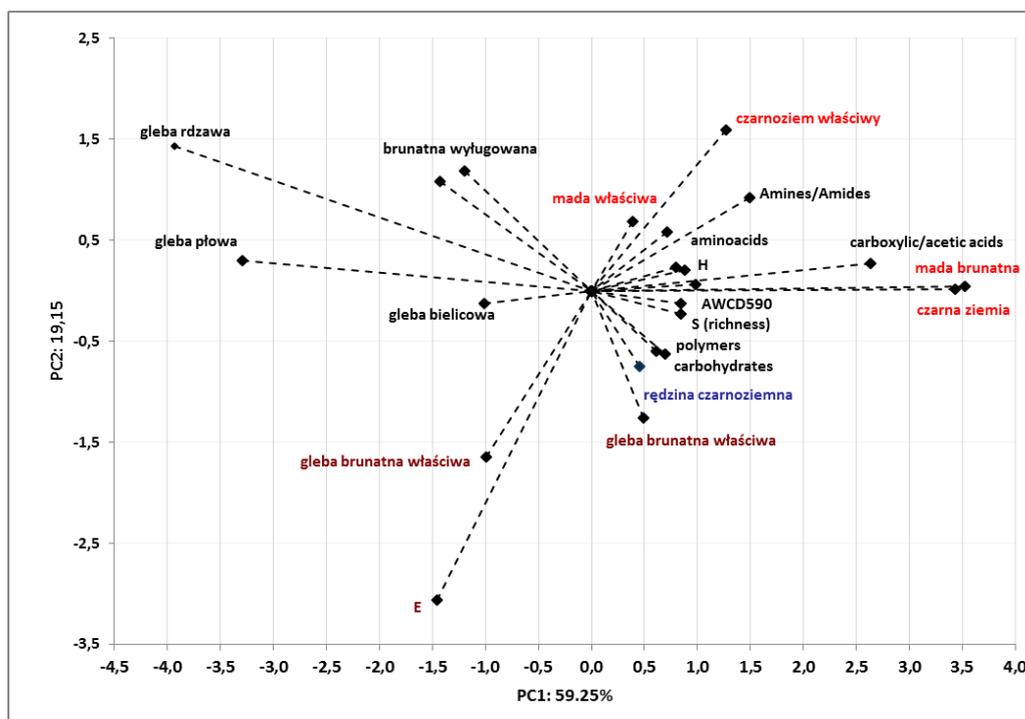
W przypadku dołączenia do analizy skupień do powyższych analiz także parametrów aktywności funkcjonalnej mikroorganizmów obliczonych dla 120h inkubacji płytek Biolog EcoPlates w analizie skupień uzyskano trzy główne grupy. Oprócz dwóch głównych grup związanych jak powyżej z aktywnością biologiczną grzybów i bakterii dołączono grupę związaną z aktywnością metaboliczną oraz funkcjonalną mikroorganizmów (Rys. 22).

Rys. 22. Analiza skupień – metoda Warda.



Dla każdej z prób glebowych pod kątem analizy aktywności metabolicznej gleb po 120h inkubacji płytek Biolog EcoPlates wyliczono także wskaźnik bogactwa R (Richness), AWCD (well colour development) > 0,25 oraz wskaźnik różnorodności Shannon-Weaver (H). Najwyższą aktywność w ocenie różnorodności profilu metabolicznego gleby uzyskano w okresie od 120h inkubacji płytek. Po upływie 144h prawie w 100% substratów zostało wykorzystane przez mikroorganizmy. Aktywność metaboliczna gleb była silnie skorelowana z typem gleby. Wyniki analiz przedstawiono w postaci graficznej z zastosowaniem analizy głównych składowych (Rys. 23). Glebami o najwyższej aktywności biologicznej były następujące typy: czarnoziemy właściwe, mady właściwe, rędziny czarnoziemne, mady brunatne oraz czarne ziemie.

Rys. 23. Analiza głównych składowych (PCA). W analizie przyjęto za zmienne poszczególne parametry bioróżnorodności gleb obliczone po 120h inkubacji płytek Biolog EcoPlates: sumę absorbancji dla poszczególnych grup substratów (aminokwasów, polimerów, węglowodanów, amin, kwasów karboksylowych) a także wskaźnik bogactwa R (Richness), AWCD (well colour development) oraz wskaźnik różnorodności Shannon-Weaver (H).



V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Najwyższą zawartością glomalin ogólnych (TG), łatwoekstrahowalnych (EEG) oraz białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) charakteryzowała się gleba pobrana spod uprawy pszenicy ozimej w systemie ekologicznym. Z kolei najniższe zawarości glomalin stwierdzono w glebie pobranej z systemu integrowanego. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w zawartości glomalin w glebach pobranych z systemu konwencjonalnego oraz integrowanego. Najwyższą zawartość glomalin stwierdzono w warstwach od 0 do 20 cm, natomiast najniższą w warstwie 30-35 cm.
2. Najwyższy procent kolonizacji grzybów AM stwierdzono w ryzosferze pszenicy uprawianej w systemie integrowanym (48,0%) a najniższy w monokulturze (36,5%). Z drugiej jednak strony najwyższą liczebność spor grzybów mykoryzowych o

średnicy 50 μm stwierdzono w glebie pobranej spod uprawy pszenicy ozimej w systemie ekologicznym a najmniejszą w glebie spod uprawy w monokulturze.

3. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż system ekologicznej uprawy okazał się najlepszym systemem wśród badanych do rozwoju grzybów AM i produkcji przez nie glomalin. Z kolei 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.
4. Na zawartość glomalin w glebie decydujący wpływ miały także techniki przygotowania gleby do siewu. W przeprowadzonych badaniach najniższe zawartości glomalin ogólnych stwierdzono w glebie spod uprawy kukurydzy z zastosowaniem pełnej uprawy płużnej a najwyższe z zastosowaniem siewu bezpośredniego.
5. Najwyższą liczebność grzybów AM stwierdzono w glebie pobranej spod uprawy kukurydzy z zastosowaniem siewu bezpośredniego. Ponadto liczebność spor grzybów AM o średnicy 50-74 μm była silnie skorelowana zarówno z zawartością glomalin ogólnych (TG), jak i glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG).
6. W przypadku monokultury bezorkowej z zastosowaniem siewu bezpośredniego oraz w monokulturze uproszczonej stwierdzono najwyższą stabilność agregatów glebowych a tym samym najmniejszą podatność gleb na destrukcję (RDC w przedziale 0,21-0,3 oraz RDC <0,2). Ponadto zarówno zawartość białek TG, EEG jak i GRSP wykazywała silne korelacje z zawartością łatwo dyspergowanego łu (RDC).
7. Stężenie glomalin zależało zarówno od typu jak i gatunku gleb. Najwyższe stężenie glomalin ogólnych stwierdzono w madach czarnoziemnych, czarnoziemach właściwych oraz czarnych ziemiach właściwych. Glebami o najwyższym stężeniu białek EEG były: mady czarnoziemne, czarne ziemie zdegradowane, czarne ziemie właściwe, czarnoziemy właściwe oraz gleby brunatne właściwe i mady brunatne.
8. Stężenie glomalin w glebie silnie korelowało z takimi parametrami właściwości gleb jak: C_{org} , N_{org} , zawartość Ca^{2+} oraz Mg^{2+} oraz stężeniem magnezu przyswajalnego.
9. Najsilniejsze korelacje stwierdzono pomiędzy ogólną zawartością białek glebowych spokrewnionych z glomalinami (GRSP) a stężeniem glomalin ogólnych (TG) ($r=0,948$). Ponadto silne korelacje stwierdzono także pomiędzy zawartością glomalin łatwoekstrahowalnych (EEG) a stężeniem białek GRSP ($r=0,819$).
10. Nie stwierdzono natomiast silnych korelacji pomiędzy stężeniem glomalin a zawartością węgla organicznego. Korelacje te wynosiły odpowiednio: dla białek TG

($r=0,429$), dla białek EEG ($r=0,465$) oraz dla białek glebowych spokrewnionych z glomalinami GRSP ($r=0,471$).

11. Otrzymane wyniki badań potwierdzają przyjętą hipotezę, że zawartość glomalin ogólnych i łatwoekstrahowalnych może być miarodajnym wskaźnikiem oceny jakości gleb użytkowanych rolniczo.
12. Grzyby AMF są biotrofami i w związku z tym zwiększenie ich populacji w glebach przez stosowanie szczepionek zawierających te grzyby jest w uprawach polowych bardzo trudne, zarówno z przyczyn technicznych jak i ekonomicznych. Na populacje tych grzybów, a więc i na zawartość glomaliny w glebach rolniczych można wpłynąć przede wszystkim poprzez dobór uprawianych roślin i odpowiednie zabiegi agrotechniczne sprzyjające rozwojowi grzybów mykoryzowych.
13. Wyniki badań, przeprowadzone w ramach niniejszego tematu przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat czynników sprzyjających gromadzeniu się glomaliny w glebach uprawnych. W aspekcie praktycznym, uzyskane wyniki mogą dać podstawę do wskazania zabiegów agrotechnicznych prowadzących do tego celu. Zdaniem autorów temat ten, inicjując badania nad glomaliną w naszym kraju przyczynił się do rozwoju wielokierunkowych badań, zarówno nad fizjologiczną rolą tej substancji jak i jej znaczeniem dla jakości gleb i ich odporności na degradację.
14. Zaplanowane prace badawcze nad efektami oddziaływania systemów produkcji i uprawy roli na glebę na podstawie zmian wybranych parametrów jakości biologicznej gleby pozwoliły na dokładniejsze przeanalizowanie zmian nie tylko ilościowych, ale i jakościowych zachodzących w glebowej materii organicznej i społeczności mikroorganizmów glebowych oraz poznanie tych zależności w szerszym aspekcie ochrony produktywności gleby oraz ochrony agroekosystemu.

VI. FORMA OPRACOWANIA WYNIKÓW BADAŃ

Dotychczasowe wyniki realizacji tematu badawczego 1.16. opracowano w następującej formie:

- raporty roczne i raport końcowy,
- publikacje naukowe 7; z czego 5 z kat. A, 2 z kat. B
- referaty - 11
- postery – 18, na konferencjach międzynarodowych oraz krajowych

Publikacje:

1. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J., Księżniak J. 2017. The effect of total and easily extractable glomalin – related soil protein (GRSP) on soil quality in long-term monoculture of maize. *Plant Soil Environment*, Vol. 63, 2017, No. 7: 300–306 (25 pkt., IF₂₀₁₆ = 1.225)
2. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J., Frąc M., Księżniak J. 2017. Microbial community diversity and their interaction of soil under maize growth in different cultivation techniques. *Plant Soil Environment*, Vol. 63, 2017, No. 6: 264–270 (25 pkt., IF₂₀₁₆ = 1.225)
3. Gałązka A., Gawryjolek K., Perzyński A., Gałązka R., Księżak J. 2016. Changes of enzymatic activities and microbial communities in soil under long-term maize monoculture and crop rotation. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 26, No. 1 (2017), 39-46 (MNiSW 15 pkt., IF₂₀₁₆ = 0.793)
4. Gałązka A. Zawartość ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w różnych typach gleb Polski spod upraw żyta i pszenicy. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* nr 587, 2016, 3–11 (13 pkt MNiSW)
5. Gałązka A., Gawryjolek K. Czy białko może być obecne w glebie nawet 20 lat? Ocena zawartości ogólnych i łatwoekstrahowalnych glomalin w archiwalnych próbach glebowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* nr 587, 2016, 13–21 (13 pkt MNiSW)
6. Gałązka A., Gawryjolek K. 2015. Glomalina – glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej. *Postępy Mikrobiologii* 54(3): 331-343. (IF₂₀₁₅=0,23), (MNiSW 15 pkt., IF₂₀₁₅=0.236)
7. Gałązka A., Gawryjolek K., Gajda A., Furtak K., Księżniak A., Jończyk K. Assessment of glomalins content in the soil under winter wheat from different crop production systems. *Plant Soil Environment* – w recenzji

Referaty

1. Gałązka Anna, Gawryjolek Karolina, Grządziel Jarosław, Siebielec Grzegorz. Bioróżnorodność funkcjonalna mikroorganizmów glebowych jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo. Konferencja naukowa „Bioróżnorodność środowiska

- znaczenie, problemy, wyzwania. Puławy, 30-31 maja 2017. Materiały konferencyjne ISBN 978-83-7562-258-4, strona 30.
2. Gałązka A., Gawryjołek K., Grządziel J. Bioróżnorodność funkcjonalna mikroorganizmów glebowych jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo na przykładzie reprezentatywnych gleb województwa lubelskiego. VII Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Agronomicznego „Bioróżnorodność – nowe wyzwania dla rolnictwa w Polsce”, Rzeszów, 11-13.09.2017, ISBN 978-83-7996-447-5, strona 24.
 3. Gałązka A., Gawryjołek K., Grządziel J. Ocena bioróżnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych w różnych typach gleb jako wskaźnik jakości środowiska glebowego. 51 Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologiczna „Mikrobiologia środowiska szansą bezpiecznego życia i postępu biotechnologicznego. 5-8 września.2017, Toruń-Ciechocinek, strona 21
 4. Gałązka A., Karolina Gawryjołek, Jarosław Grządziel – Porównanie biochemicznych i mikrobiologicznych wskaźników aktywności biologicznej w ocenie jakości środowiska glebowego na przykładzie reprezentatywnych gleb Polski. IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Biologiczne Metody Oceny Stanu Środowiska Przyrodniczego, Szczecin-Siemczyno, 7-9 czerwca 2017. Materiały Konferencyjne ISBN 978-83-944786-2-9, strona 18.
 5. Gałązka A. Znaczenie glomalin, glikoprotein produkowanych przez grzyby mykoryzowe w tworzeniu jakości środowiska glebowego. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości” Bydgoszcz, 25-27 września 2016.
 6. Gałązka A., Gawryjołek K., Grządziel J. Czy białko może być obecne w glebie nawet 20 lat? Ocena zawartość ogólnych i łatwoekstrahowalnych glomalin w archiwalnych próbach glebowych. Kraków – Sieniawa, 06-09.09.2016 r. 50 Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Mikroorganizmy w ochronie środowiska i biotechnologii”. Materiały konferencyjne ISBN 978-83-908452-2-7, str. 78.
 7. Gałązka A. Udział białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w tworzeniu jakości środowiska glebowego. V Konferencja Naukowa „Nowe patogeny i choroby roślin”, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, Skierniewice 06.04.2016. Materiały konferencyjne ISBN 978-83-7987-888-8, str. 17.
 8. Gałązka A. 49 Ogólnopolska Konferencja Naukowa “Mikroorganizmy – Środowisko-Biotechnologia” Szczecin – Siemczyno, 01-04.09.2015. “Ocena aktywności biologicznej gleb w długoletniej monokulturze z uwzględnieniem zawartości ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami”
 9. Gałązka A. 49 Ogólnopolska Konferencja Naukowa “Mikroorganizmy – Środowisko-Biotechnologia” Szczecin – Siemczyno, 01-04.09.2015. “Ocena aktywności biologicznej gleb w długoletniej monokulturze z uwzględnieniem zawartości ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami”
 10. Gałązka A. VI Konferencja Naukowa „Badania i innowacje w produkcji roślinnej” Kraków 17-19.09.2015. „Ocena aktywności biologicznej gleb w trzech systemach uprawy roli”
 11. Gałązka A. Lublin 06.12.2015. Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne Oddział Lublin „Glomalina glikoproteina produkowana przez grzyby endomykoryzowe”.

Postery:

1. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J. The comparison of biochemical and microbiological indicators of soil quality on example of representative soils of Poland. 7th International Weigl Conference, September 26-29, 2017, Lviv, Ukraine, Conference papers, page: 94.
2. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J. Assesment of the metabolic diversity of microorganisms and glomalin contents as a soil environmental quality indicator. 7th International Weigl Conference, September 26-29, 2017, Lviv, Ukraine, Conference papers, page: 94.
3. Gawryjolek K., Gałązka A. The differentiation of soil enzymatic activity exemplified by the soils typical of Lublin voivodship. 7th International Weigl Conference, September 26-29, 2017, Lviv, Ukraine, Conference papers, page: 99.
4. Gałązka A., Gawryjolek K., Abramczyk B., Łyszcz M. Ocena aktywności enzymatycznej w monitoringu gleb uprawnych w Polsce. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biotechnologia – energia jutra”, Lublin, 19-20 października 2017. ISBN 978-83-948570-0-4, strona 50
5. Gałązka A., Grządziel J. Ocena różnorodności genetycznej grzybów oraz profilu metabolicznego w długoletniej monokulturze kukurydzy z zastosowaniem różnych technik uprawy gleby. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biotechnologia – energia jutra”, Lublin, 19-20 października 2017. ISBN 978-83-948570-0-4, strona 62
6. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J., Niedźwiecki J. „Zawartość glomalin jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo”. Krajowa Platforma Glebowa, Konferencja Naukowa „Krajowe bazy danych o glebach – stan, wykorzystanie, potrzeby”, Warszawa, 21 września 2017 r. ISBN 978-83-7562-266-9, strona 38.
7. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J., Siebielec G., Smreczak B. Profil metaboliczny i bioróżnorodność strukturalna jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo. Krajowa Platforma Glebowa, Konferencja Naukowa „Krajowe bazy danych o glebach – stan, wykorzystanie, potrzeby”, Warszawa, 21 września 2017 r. ISBN 978-83-7562-266-9, strona 39.
8. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J., Księżak J. Ocena bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów w glebie spod uprawy kukurydzy w monokulturze i zmianowaniu. VII Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Agronomicznego „Bioróżnorodność – nowe wyzwania dla rolnictwa w Polsce”, Rzeszów, 11-13.09.2017, ISBN 978-83-7996-447-5, strona 36.
9. Gałązka A., Gawryjolek K., Grządziel J. Mikrobiologiczne i biochemiczne wskaźniki aktywności biologicznej w ocenie jakości środowiska glebowego na przykładzie reprezentatywnych gleb Polski. 51 Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologiczna „Mikrobiologia środowiska szansą bezpiecznego życia i postępu biotechnologicznego. 5-8 września.2017, Toruń-Ciechocinek, strona 50

10. Gałązka A., Karolina Gawryjołek, Jarosław Grządziel – Ocena potencjalnej różnorodności metabolicznej populacji mikroorganizmów oraz zawartości glomalin jako wskaźnik jakości środowiska glebowego. IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Biologiczne Metody Oceny Stanu Środowiska Przyrodniczego, Szczecin-Siemczyno, 7-9 czerwca 2017. Materiały Konferencyjne ISBN 978-83-944786-2-9, strona 44.
11. Gałązka A., Gawryjołek K., Grządziel J., Frąc M., Księżak J. Ocena bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów w glebie spod uprawy kukurydzy w długoletniej monokulturze. II Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy różnych środowisk” Lublin, 29-30 czerwca 2017, strona 78, ISBN 978-83-89969-48-4
12. Gałązka A., Gawryjołek K., Grządziel J., Księżak J. Determination of structural biodiversity and metabolic profiles in soil under long-term monoculture of maize. 11th International Conference on Agrophysics: Soil, Plant & Climate ICA 2016, 26-28.09.2016, Lublin Poland. Materiały konferencyjne ISBN 978-83-89969-43-9, str. 102
13. Gałązka A., Gawryjołek K., Księżak J. Changes of enzymatic activities and microbial communities in soil under long-term maize monoculture and crop rotation. 11th International Conference on Agrophysics: Soil, Plant & Climate ICA 2016, 26-28.09.2016, Lublin Poland. Materiały konferencyjne ISBN 978-83-89969-43-9, str. 103.
14. Gałązka A., Siebielec S., Gawryjołek K. Warsztaty Naukowe “Instrumenty i metody przeciwdziałania degradacji gleb użytkowanych rolniczo” Puławy 8-9.10.2015 “Ocena zawartości ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w zależności od system uprawy zbóż”
15. Gałązka A., Gawryjołek K. Warsztaty Naukowe “Instrumenty i metody przeciwdziałania degradacji gleb użytkowanych rolniczo” Puławy 8-9.10.2015 “Zawartość ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w długoletniej monokulturze kukurydzy”
16. Gałązka A., Gawryjołek K. 49 Ogólnopolska Konferencja Naukowa “Mikroorganizmy – Środowisko-Biotechnologia” Szczecin – Siemczyno, 01-04.09.2015. “Zawartość ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w różnych typach gleb Polski spod uprawy żyta i pszenicy”
17. Gawryjołek K., Gałązka A. Ocena jakości gleby w długoletniej monokulturze kukurydzy z uwzględnieniem zawartości ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Mikrobiologia w Medycynie, Przemysle i Ochronie Środowiska” Łódź, 24-25.10.2015.
18. Gałązka A., Martyniuk S., Gawryjołek K. Zawartość ogólnych i łatwoekstrahowalnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w różnych typach gleb Polski spod upraw żyta i pszenicy. Ogólnopolska Konferencja

LITERATURA

1. Bai Ch., He X., Tang H., Shan B., Zhao L.: Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 941–947 (2009)
2. Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C.: Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**, 1761–1778 (2005)
3. Bedini S., Pellegrino E., Avio L., Pellegrini S., Bazzoffi P., Argese E., Giovannetti M.: Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1491–1496 (2009)
4. Bedini S., Turrini A., Rigo Ch., Argese E., Giovannetti M.: 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 (2010)
5. Bielińska E.J., Kolodziej B., Sugier D.: Relationship between organic carbon content and the activity of selected enzymes in urban soils under different anthropogenic influence. *J. Geochem. Explor.* **129**, 52–56 (2013)
6. Bird S.B., Herrick J.E., Wander M.M., Wright S.F.: Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environ. Pollut.* **116**, 445–455 (2012)
7. Błaszowski J.: Przeszłość, terażniejszość i przyszłość klasyfikacji arbuskularnych grzybów mikoryzowych. *Kosmos*, **53**, 17–24, 2004
8. Bradford M.M.: A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976)
9. Burrows R. L.: Glomalin Production and Infectivity of Arbuscular-Mycorrhizal Fungi in Response to Grassland Plant Diversity. *Am. J. Plant Sci.* **5**, 103–111 (2014)
10. Buyer J.S., Zuberer D.A., Kristine A., Nichols K.A., Franzluebbers A.J.: Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant Soil*, **339**, 401–412 (2011)
11. Driver J.D., Holben W.E., Rillig M.C.: Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 101–106 (2005)
12. Feeney D.S., Daniell T., Hallett P.D., Illian J., Ritz K., Young I.M.: Does the presence of glomalin relate to reduced water infiltration through hydrophobicity? *Can. J. Soil Sci.* **84**, 365–372 (2004)
13. Frank V. Schindler F.V., Mercer E.J., Rice J.A.: Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 320–329 (2007)

14. Franzluebbers A.J., Wright S.F., Stuedemann J.A.: Soil aggregation and glomalin under pastures in the Southern Piedmont USA. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**, 1018–1026 (2000)
15. Gadkar V., Rillig M.C.: The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 93–101 (2006)
16. Gałązka A.: Charakterystyka glomalin i oddziaływania różnych systemów uprawy na ich zawartość w glebie. *Pol. J. Agronom.* **15**, 75–82 (2013)
17. Gerdemann J.W.: Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopath.* **6**, 397–418, (1968)
18. 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.: Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 766–777 (2011)
19. Guo H., He X.L., Li Y.P.: Spatial distribution of arbuscular mycorrhiza and glomalin in the rhizosphere of *Caragana korshinskii* Kom. in the Otindag sandy land, China. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**, 5745–5753 (2012)
20. Hallett P.D., Feeney D.S., Bengough A.G., Rillig M.C., Scrimgeour C.M., Young I.M.: Disentangling the impact of AM fungi versus roots on soil structure and water transport. *Plant and Soil*, **314**, 183–196 (2009)
21. Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W.: Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* **168**, 293–303 (2005)
22. Hontoria Ch., Velasquez R., Benito M., Almorox J., Moliner A.: Bradford-reactive soil proteins and aggregate stability under abandoned versus tilled olive groves in a semi-arid calcisol. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1583–1585 (2009)
23. Idris A., Labuschagne N., Korsten L.: Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *J. Agric. Sci.* **147**, 17–30 (2009)
24. Kamiński F.: Die Vegetationsorgane der *Monotropa hypopitys*. *L. Bot. Zeitschr.* **29**, 225–234 (1881)
25. Khan A.G.: Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on the trace metal contaminated soils in the phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Bio.* **18**, 355–364 (2005)
26. Knorr M.A., Boerner R. E. J., Rillig M. C.: Glomalin content of forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza*, **13**, 205–210 (2003)
27. Koide R.T., Mosse B.: A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, **14**, 145–163 (2004)
28. Lee J.E., Eom A.-H.: Effect of Organic Farming on Spore Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin in Soil. *Mycobiology*, **37**, 272–276 (2009)
29. Liu Q.M., Cao Y.L., Huang Y.F., Zhang Y.P., Lin J.Q., Lin J.M., Xu L.S.: Soil organic matter dynamics after C3-C4 vegetation change of red soil in southern China: Evidence from natural ¹³C abundance. *Contemp. Probl. Ecol.* **6** (5), 513–519 (2013)

30. Lovelock C.E., Wright S.F., Nichols K.A.: Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1009–1012 (2014)
31. Lovelock C.E., Wright S.F., Nichols K.A.: Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rainforest soil. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1009–1012 (2004)
32. Lutgen E.R., Muir-Clairmont D., Graham J., Rillig M.C.: Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. *Plant Soil*, **257**, 71–83 (2003)
33. Miller R.M., Jastrow J.D.: Mycorrhizal fungi influence soil structure. *Molecul. Biol. Physiol.* **40**, 3–18 (2000)
34. Mirás-Avalos J.M., Antunes P.M., Koch A., Khosla K., Klironomos J.N., Dunfield K.E.: The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia*, **54**, 235–241 (2011)
35. Newman E.I.: Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. *Adv. Ecol. Res.* **18**, 243–270 (1988)
36. Nichols K.A., Wright S.F.: Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils. *Soil Sci.* **170**, 985–997 (2005)
37. Nichols K.A., Wright S.F.: Carbon and nitrogen in operationally-defined soil organic matter pools. *Biol. Fertil. Soils.* **43**, 215–220 (2006)
38. Oades J.M.: Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil*, **76**, 319–337 (1984)
39. Parniske M.: Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 763–775 (2008)
40. Phillips R.P., Fahey T.J.: The influence of soil fertility on rhizosphere effects in northern hardwood forest soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **72**, 453–461 (2008)
41. Purin S., Rillig M.C.: The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, **51**, 123–130 (2007)
42. Rillig M.C., Mummey D.L.: Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **171**, 41–53 (2006)
43. Rillig M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J. Soil. Sci.* **84**, 355–363 (2004)
44. Rillig M.C., Maestre F.T., Lamit L.J.: Microsite differences in fungal hyphal length, glomalin, and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 1257–1260 (2003)
45. Rillig M.C., Ramsey P.W., Morris S., Paul E.A.: Glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant Soil*, **253**, 293–299 (2003)
46. Rillig M.C., Steinberg P.D.: Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1371–1374 (2002)
47. Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T.: The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil*, **238**, 325–333 (2002)

48. Rillig M.C., Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F., Torn M.S.: Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*, **233**, 167–177 (2001)
49. Rillig, M.C., Wright S.F., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., Ottman M.J., Leavitt S.W.: Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Glob. Change Biol.* **7**, 333–337 (2001)
50. Roger-Estrade J., Anger Ch., Bertrand M., Richard G.: Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. *Soil Till. Res.* **111**, 33–40 (2010)
51. Rosier C.L., Piotrowski S.J., Hoyer A.T., Rillig M.C.: Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. *Pedobiologia*, **52**, 41–50 (2008)
52. Rosolem C.A., Calonego J.C.: Phosphorus and potassium budget in the soil-plant system in crop rotations under no-till. *Soil Till. Res.* **126**, 127–133 (2013)
53. Ruiz-Lozano J.M. Azcón R.: Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *G. deserticola* under salinity. *Mycorrhiza*, **10**, 137–143 (2000)
54. Ryan, M.H., Graham J.H.: Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant Soil*, **244**, 263–271 (2002)
55. Sarkar D., Kumar De D., Das R., Mandal B.: Removal of organic matter and oxides of iron and manganese from soil influences boron adsorption in soil. *Geoderma*, 214–215, 213–216(2014)
56. Schüßler A.: Phylogeny and taxonomy of *Glomeromycota* (‘arbuscular mycorrhizal (AM) and related fungi’), <http://www.amf-phylogeny.com> (18 marca 2015 roku)
57. Schüßler A., Schwarzott D., Walker C.: A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**, 1413–1421 (2001)
58. Simansky V., Bajcan D., Ducsay L.: The effect of organic matter on aggregation under different soil management practices in a vineyard in an extremely humid year. *Catena*, **101**, 108–113 (2013)
59. Singh P.K., Singh M., Tripathi B. N.: Glomalin: an arbuscular mycorrhizal soil protein. *Protoplasma*, **250**, 663 – 669 (2013)
60. Singh P. K.: Role of glomalin related soil protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Agric. Sci. Res. J.* **2**, 119–125 (2012)
61. Steinberg P.D., Rillig M.C.: Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 191–194 (2003)
62. Treseder K.K., Turner K.M.: Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **71**, 1257–1266 (2007)
63. Violi H.A., Treseder M.J.A., Wright S.F., Lovatt C.J.: Density dependence and interspecific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi mediated plant growth, glomalin production, and sporulation. *Can. J. Bot.* **85**, 63–75 (2007)
64. Wilson G. W. T., Rice C. W., Rillig M. C., Springer A., Hartnett D. C.: Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecol. Lett.* **12**, 452–461 (2009)

65. Wright S.F., Green V.S., Cavigelli M.A.: Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. *Soil Till. Res.* 94, 546–549 (2007)
66. Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F.: Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. *Chemosphere*, 64, 1219–1224 (2006)
67. Wright S.F., Jawson L.: A pressure cooker method to extract glomalin from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 1734–1735 (2001)
68. Wright S.F.: A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 226, 171–177 (2000)
69. Wright S.F., Anderson R. L.: Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. *Biol. Fert. Soils* 31, 249–253 (2000)
70. Wright S.F., Starr J.L., Paltineanu I.C.: Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1825–1829 (1999)
71. Wright S.F., Upadhyaya A.: Quantification of arbuscular mycorrhizal activity by the glomalin concentration on hyphae. *Mycorrhiza*, 8, 283–285 (1999)
72. Wright S.F., Upadhyaya A.: Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soil by capillary electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1853–1857 (1998)
73. Wright S.F., Upadhyaya A.: A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 198, 97–107 (1998)
74. Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., Upadhyaya A.: 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 (1996)
75. Wright S.F., Upadhyaya A.: Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161, 575–586 (1996)
76. Wu F.S., Dong M. X., Liu Y.J., Ma X.J., An L.Z., Young J.P.W., Feng H.Y.: Effects of long-term fertilization on AM fungal community structure and glomalin-related soil protein in the Loess Plateau of China. *Plant Soil*, 342 (1–2), 233–247 (2011)
77. Wu Q.S., He X.H., Zou Y.N., He K.P., Sun Y.H., Cao M.Q.: Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationships with root mycorrhization, soil aggregates, carbohydrates, activity of protease and β -glucosidase in the rhizosphere of *Citrus unshiu*. *Soil Biol. Biochem.* 45, 181–183 (2012).

Puławy, dn. 04.12.2017 r.

Zespół badawczy tematu:

prof. dr hab. Stefan Martyniuk.....

dr Anna Gałązka.....

dr Andrzej Księżniak.....

dr Grzegorz Siebielec.....

mgr Karolina Gawryjołek.....

mgr Sylwia Siebielec.....