

Małgorzata Łyszcz¹, Anna Gałązka^{1*}

¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w grudniu 2016 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego DGGE, elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE. 3. Polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA SSCP. 4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). 5. Podsumowanie

Genetic differentiation methods of microorganisms in the soil – plant system

Abstract: Biodiversity is a key concept in finding important features of new microorganisms. Microorganisms play an important role in the soil ecosystem and participate, among others, in such processes as the maintenance of soil structure, humification, release of organic compounds, disposal of pollutants and transformation of organic matter. The maintenance of competent state of soil microbial communities, i.e. the appropriate microorganism count, activity and diversity, is a necessary condition for the functioning of a highly complex system such as the soil. Phyllosphere bacteria have the potential to influence plant biogeography and ecosystem function through their influence on plant performance under different environmental conditions, but the drivers of variation in leaf-associated bacterial biodiversity among host plants are not well understood. Hence, undoubtedly, an important research aspect is the selection and development of indicators to evaluate microbial biodiversity of the soil and plant phyllosphere. In this publication, selected molecular methods used for the diversity assessment of microorganisms have been presented.

1. Introduction. 2. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DGGE, Temperature Gradient Gel Electrophoresis TGGE, 3. SSCP – single strand conformation polymorphism. 4. Real-Time Quantitative PCR. 5. Summary

Słowa kluczowe: bioróżnorodność, elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego, polimorfizm nici DNA, Real Time PCR
Key words: biodiversity, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, single strand conformation polymorphism, Real Time PCR

1. Wstęp

Mikroorganizmy tworząc wielogatunkowe zbiorowiska, wytwarzają sieć zależności między poszczególnymi grupami fizjologicznymi [9]. Procesy syntezy i degradacji, przeprowadzane przez zbiorowiska mikroorganizmów, powinny być postrzegane jako suma funkcji, za które odpowiadają zespoły drobnoustrojów, a nie tylko pojedyncze gatunki. Badania aktywności mikroorganizmów w zbiorowiskach są niezbędne w celu poznania ekologii drobnoustrojów w biocenozach i powinny być analizowane w powiązaniu z istniejącymi warunkami środowiskowymi.

Różnorodność mikrobiologiczna może być ograniczona w warunkach naturalnych poprzez nieodpowiednie czynniki środowiskowe, do których należą m.in. ograniczone zasoby pokarmowe oraz zaburzenia ekologiczne i fizyczne czynniki przewyższające tolerancję organizmu, jak również interakcje międzygatunkowe uniemożliwiające występowanie lub utrzymanie gatunku w danym środowisku [18]. Stąd też niewątpli-

wie ważnym aspektem badawczym jest dobór i opracowanie wskaźników do oceny i kształtowania bioróżnorodności mikrobiologicznej środowiska glebowego i aktywności mikroorganizmów glebowych w różnych warunkach siedliskowych roślin oraz w różnych systemach gospodarowania [20, 32].

Prawidłową strukturę gleby oraz jej żyzność warunkuje wzmożona aktywność biologiczna gleby, tzn. prawidłowy rozwój, liczbę oraz skład gatunkowy mikroorganizmów, a także ich aktywność enzymatyczna. Drobnoustroje glebowe stanowią bardzo ważną funkcjonalnie grupę, należącą do organizmów zasiedlających glebę. Stąd też w badaniach nad występowaniem mikroorganizmów glebowych nie tylko ważna jest ich sama jakościowa i ilościowa obecność, ale przede wszystkim pełnione przez nie funkcje, ich rola w danym ekosystemie [8].

Fyllosfera wraz z zasiedlającymi ją organizmami ma duże znaczenie środowiskowe i rolnicze, głównie ze względu na wpływ mikroorganizmów na wzrost, rozwój a tym samym plonowanie roślin. Sprawia to, że

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 81 478 69 50; agalazka@iung.pulawy.pl

mikroorganizmy wraz z komórkami gospodarza tworzą kompleksowy ekosystem decydujący o wielu różnych procesach biologicznych. Mikroorganizmy kolonizują różne części roślin, występują na powierzchni liści, na korzeniach, w nasionach oraz międzykomórkowo i wewnątrzkomórkowo w tkankach i w wiązkach przewodzących. Miejsca te cechują się innymi warunkami i innymi wydzielinami, które mogą być źródłem węgla i energii lub czynnikiem hamującym rozwój dla określonych mikroorganizmów. Zasiedlenie powierzchni liści jest uzależnione od wielu czynników środowiskowych, od oddziaływań liść – środowisko oraz fizycznych i genetycznych właściwości rośliny i mikroorganizmów oraz sposobu uprawy i ochrony roślin. Często oddziaływanie to pozytywnie wpływa na rozwój roślin, przykładem może być wiązanie azotu atmosferycznego, poprawa nabycia składników odżywczych, ograniczenie infekcji patogenów roślinnych lub też degradacja niektórych zanieczyszczeń środowiskowych [29, 34]. Badania z zakresu różnorodności mikroorganizmów w środowisku, w tym i na powierzchni roślin są ważnym aspektem nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z powodu dokładnego zrozumienia interakcji pomiędzy bioróżnorodnością a funkcją i strukturą konsorcjum mikroorganizmów.

W badaniach środowiskowych dąży się do wykorzystywania metod diagnostycznych, które precyzyjnie i w krótkim czasie oceniają stan drobnoustrojów występujących w danym środowisku. Szybkie i ciągłe zmiany środowiska glebowego czy też fylosfery powodują potrzebę tworzenia precyzyjnych testów diagnostycznych. Ponieważ większości drobnoustrojów nie można wyhodować na podłożach mikrobiologicznych, stąd też najskuteczniejszą metodą ich identyfikacji i analiz są metody biologii molekularnej. Badania środowiskowe coraz częściej koncentrują się na próbach oceny zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów zachodzących pod wpływem czynników abiotycznych i biotycznych. Poszukuje się specjalnych bioindykatorów, które określają dowolną, genetycznie kontrolowaną cechę fenotypową lub też dowolną różnicę genetyczną wykorzystywaną w celu ujawnienia polimorfizmu osobniczego. W ten sposób określone są różnice występujące między poszczególnymi osobnikami, gatunkami i odmianami. Wskaźniki te nie powinny podlegać wpływom czynników środowiskowych, a ich główną zasadą jest ujawnianie szerokiego zakresu zmienności badanej cechy [32, 40]. Dobry system markerowy jest przede wszystkim powtarzalny, tani, wiarygodny, łatwy w aplikacji i nie wymagający skomplikowanego sprzętu do detekcji uzyskanych produktów. Dobór optymalnego systemu w badaniach genetycznych niejednokrotnie nastęrcza genetykom wiele trudności. Niemniej jednak wśród wielu dostępnych systemów markerowych i związanych z nimi technik można wybrać takie, które

właściwie zidentyfikują zmienność badanych sekwencji nukleotydowych. Poszczególne systemy różnią się między sobą, co wynika z ich specyfiki oraz typu i poziomu polimorfizmu, który określają [9, 40]. Narzędziami umożliwiającym analizę różnorodności mikrobiologicznej są techniki biologii molekularnej, techniki genetyczne, a wśród nich jedną z najważniejszych jest łańcuchowa reakcja polimerazy, czyli PCR (Polymerase Chain Reaction), technika opracowana w latach 1980. Większość metod analizy bioróżnorodności opiera się właśnie na technice PCR. Są to między innymi PCR-RFLP, TRFLP, ARDRA, rep-PCR, RAPD [39].

Poniżej scharakteryzowano wybrane i najbardziej popularne systemy molekularne wykorzystywane w badaniach bioróżnorodności mikroorganizmów, które bazują na technice PCR i właściwościach topnienia DNA: DGGE/TGEE, SSCP i Real Time PCR.

2. Elektroforeza w gradiencie denaturującym DGGE, elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE

Jednym z najbardziej skutecznych narzędzi biologii molekularnej, pozwalającym monitorować zmiany genotypowe jest metoda PCR-DGGE. Elektroforeza ta łączy amplifikację metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem specyficznych lub ogólnych starterów z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego.

Elektroforeza w gradiencie denaturującym DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) [11–12, 45, 53–54] i elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) [45, 53–54, 65]. Są to wydajne techniki molekularne, w których mogą być rozdzielane fragmenty DNA o takiej samej długości, ale o różnej sekwencji [45, 53–54]. Rozdzielanie fragmentów DNA powstałych w trakcie elektroforezy DGGE i TGGE jest zależne od zmniejszonej ruchliwości elektroforetycznej częściowo stopionych dwuniciowych cząsteczek DNA w żelu poliakrylamidowym zawierającym liniowy gradient denaturatów DNA lub temperatury [45, 53–54]. Pierwotnie techniki te zostały opracowane w celu wykrywania punktowych mutacji w sekwencji DNA [11, 35, 79]. Muyzer i wsp. [55] rozszerzyli stosowanie metody DGGE do analizy mikrobiologicznej bioróżnorodności genetycznej. DNA genomowy ekstrahowany z próbek środowiskowych, np. z gleby jest amplifikowany za pomocą reakcji PCR przy użyciu uniwersalnych starterów, które są skierowane do części sekwencji 16S rRNA bądź 18S rRNA [10, 50]. Pierwotnie proponowany system oparty był na regionie V3 genu 16S rRNA [24]. Heuer i wsp. [25] opisali układ PCR-DGGE w oparciu o region V6 tego samego genu. Region ten charakteryzuje się największą zmiennością w całym genie rRNA, co teoretycznie pozwala

na najbardziej optymalne typowanie niemal wszystkich zbiorowisk bakteryjnych [3, 57].

Początkowo, konsorcja mikroorganizmów porównywano wykorzystując amplikony otrzymane z tak zwanych uniwersalnych starterów, np. specyficznych dla domeny *Bacteria* [2, 24, 55]. Później zostały opracowane specyficzne startery skierowane do grup drobnoustrojów, co skutkuje lepszą oceną niektórych populacji i lepszą definicją złożonych wzorów konsorcjów z takich środowisk jak gleba czy ryzosfera. Niektóre z tych specyficznych starterów skierowane są do docelowych dużych grup bakterii, takich jak α i β -*Proteobacteria* [1, 2] lub typu *Actinobacteria* [2, 23]. Dokładniejsze startery opracowano także dla rodzaju *Pseudomonas* [2, 16, 42, 48, 83], *Paenibacillus* [2, 7], *Burkholderia* [2, 66]. Opracowane zostały również startery oparte na sekwencji innych genów. Pierwszy zaprojektowany starter w analizie DGGE był oparty na genie *rpoB*, który koduje enzym polimerazę RNA [2, 59]. Do analizy DGGE wykorzystywane są, także inne geny funkcjonalne np. *nifH*, obecny w bakteriach wiążących azot [2, 64], czy gen *mxoF* obecny w *Methylobacterium* spp. i innych bakteriach metylotroficznym [2, 13, 22]. Zaletą analizy na podstawie genów funkcjonalnych jest możliwość identyfikacji mikroorganizmów jak również ocena aktywności zbiorowości w danym procesie w środowisku [2]. Po reakcji amplifikacji otrzymujemy mieszaninę fragmentów o takiej samej długości ale różnej sekwencji nukleotydowej, ponieważ w próbce znajduje się duża liczba różnych genotypów. Każdy z nich ma inną temperaturę topnienia DNA. Używane w procesie amplifikacji uniwersalne startery są bogate w sekwencje GC, mają dołączony tzw. „ogon” = „zacisk” GC, czyli fragment około 30 ÷ 40 par zasad GC, charakteryzujący się wysoką temperaturą topnienia, dzięki temu zapobiegamy całkowitemu rozszczepieniu (dysocjacji) nici DNA (przynajmniej część DNA pozostaje dwuniciowa). W przypadku braku „ogona” GC, DNA będzie ulegało denaturacji na pojedyncze nici [5, 8, 10, 35, 56, 87]. Najczęściej używanym „zaciskiem” GC jest zaprojektowany przez Muzer i wsp. [55]: 5'-CCG CGC CGC CCG GCG CCC CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'. Istnieje jeszcze kilka „zacisków” GC obecnie używanych, które różnią się właściwościami topnienia, a tym samym są przydatne w szczególnych warunkach [54, 79]. Po elektroforezie zostaje utworzony określony wzór, czyli odcisk DNA tzw. „fingerprinting” określający genetyczną bioróżnorodność. Wynik analizy DGGE/TGGE przedstawia obraz składający się z prążków o różnych intensywnościach. Intensywności prążków odpowiadają częstotliwości poszczególnych produktów PCR w mieszaninie reakcyjnej [79]. Wzory DNA można wzajemnie porównywać, a dobrze rozdzielone prążki DGGE mogą zostać wycięte z żelu i mogą

być poddane identyfikacji przy zastosowaniu techniki sekwencjonowania (Rys. 1) [87].

Rozdzielanie jest oparte na różnicy w ruchliwości częściowo stopionych cząsteczek DNA w żelach poliakrylamidowych, zawierających liniowy gradient denaturantów DNA (mocznik i formamid). W gradiencie denaturacji, fragmenty DNA migrują pod wpływem pola elektrycznego, gdy fragment DNA osiąga pozycję w gradiencie, w którym się „topi”, to mobilność fragmentu szybko się zmniejsza [79]. Różnice w sekwencji w obrębie fragmentów DNA powodują różnicę w temperaturze topnienia, a tym samym wpływają na rozdział w denaturujących żelach gradientowych [10, 30, 51, 57, 66]. Po osiągnięciu swojego punktu denaturacji, jednociowe fragmenty DNA wykazują zmniejszoną ruchliwość elektroforetyczną zwaną retardacją [33]. Różne warianty sekwencji fragmentów DNA będą więc odzwierciedleniem migracji w różnych pozycjach w żelu, zgodnie ze stężeniem środka denaturującego [10]. Teoretycznie sekwencje DNA wykazujące różnice tylko w jednej z par zasad mogą być rozdzielone techniką DGGE [10, 47]. Metoda TGGE wykorzystuje tą samą zasadę, jak DGGE, ale opiera się na gradiencie temperatur zamiast denaturantów chemicznych [10, 30, 35, 56, 63].

Główne trudności i ograniczenia metody DGGE/TGGE to:

- dobór odpowiedniego startera do przedstawiania całej populacji mikroorganizmów,
- optymalizacja warunków elektroforezy,
- ograniczona czułość w wykrywaniu rzadkich członków populacji mikroorganizmów,
- oddzielenie tylko małych fragmentów DNA do 500 par zasad,
- odchylenia w reakcji PCR, które są mogą nie wyrazić prawdziwej różnorodności, ponieważ tylko gatunki dominujące ilościowo wykrywa się z powodu dużej ilości dostępnych wzorów DNA,
- zmienna efektywność ekstrakcji DNA – ocenia się, że metodą DGGE można wykryć tylko 1–2% populacji gatunków dominujących obecnych w reprezentatywnej próbce środowiskowej,
- fragmenty DNA różniące się sekwencją mogą mieć podobne cechy mobilności w żelu poliakrylamidowym,
- zaburzenia obrazu różnorodności zespołu mikroorganizmów z powodu występowania wielu genów 16S rRNA o nieco zmiennej sekwencji [5, 10, 41–42, 44, 54–55, 73, 80].

Z kolei zaletami metod DGGE / TGGE są:

- śledzenie zmian w populacji drobnoustrojów w odpowiedzi na bodźce,
- powtarzalność metod i niskie ich koszty,
- możliwość analizowania wielu próbek równocześnie [10, 30, 35, 55].

Metody DGGE/TGGE znajdują szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących ekologii mikroorganizmów, a zwłaszcza w wykrywaniu i porównywaniu populacji drobnoustrojów, a także w analizie mikrobiologicznej różnorodności w obrębie różnych środowisk, w tym także gleb skażonych [5, 41].

Ji i wsp. [28] w glebach sztucznie zanieczyszczonych związkami z grupy monoaromatycznych węglowodorów (benzen, toluen, etylobenzen oraz ksylen), analizowali zmiany w obrębie populacji mikroorganizmów, co w rezultacie wskazywało na wzrost liczby bakterii z grupy *Acinetobacter* i *Bacillus*. Inne obserwacje dotyczące bakterii z grupy *Sphingomonas* wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych różnymi stężeniami WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) wykazały, że najmniejszą bioróżnorodność (w obrębie tego rodzaju) wykazują gleby zanieczyszczone WWA [37]. W glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi często wykształca się bardzo aktywna autochtoniczna grupa drobnoustrojów wykorzystująca składniki zanieczyszczeń jako jedyne źródło węgla [14, 15].

Z kolei celem pracy Vendan i wsp. [82] było określenie zmiany w profilach PCR-DGGE zbiorowisk bakterijskich związanych z ryzosferą żeńszczenia. Zaobserwowano różnice w dominacji intensywności pasm DNA w profilu, wskazujące na wahania w strukturze populacji mikroorganizmów. Niektóre zespoły były intensywne w profilu DGGE gleby z ryzosfery, a inne były bardzo słabe, co wskazuje, że ich poziom w populacji był niski. W glebie dominowały rzędy *Actinomycetales* z *Actinobacteria*, *Sphingomonadales* i *Rhizobiales* z *α -Proteobacteria*. Zaobserwowano, że gleba ryzosferowa jednorocznego jak i dwuletniego żeńszczenia jest bogata w bakterie z typu *Actinobacteria* i *α -Proteobacteria*. Mieszany skład organizmów odnotowano w trzecim i czwartym roku badań. Skład populacyjny bakterii w ryzosferze może zmieniać się dynamicznie i może mieć duży wpływ na rozwój roślin. Z kolei wiek rośliny jest jednym z ważniejszych czynników, które wpływają na mikrobiologiczną populację związaną z ryzosferą rośliny.

Yang i wsp. [86] analizowali mikroorganizmy zasiedlające fyllosferę roślin uprawnych tj. cztery odmiany drzew cytrusowych, bawełnę, kukurydzę, buraki cukrowe i zieloną fasolę. W badaniach wykorzystali technikę DGGE z ogólnymi starterami do genu 16S rRNA. Badania wykazały, że struktura konsorcjum mikroorganizmów była podobna w różnych odmianach tego samego gatunku rośliny (odmiany drzew cytrusowych), a unikalna w różnych gatunkach roślin. W grupie drzew cytrusowych, podobne struktury mikroorganizmów wyróżniono w dwóch odmianach.

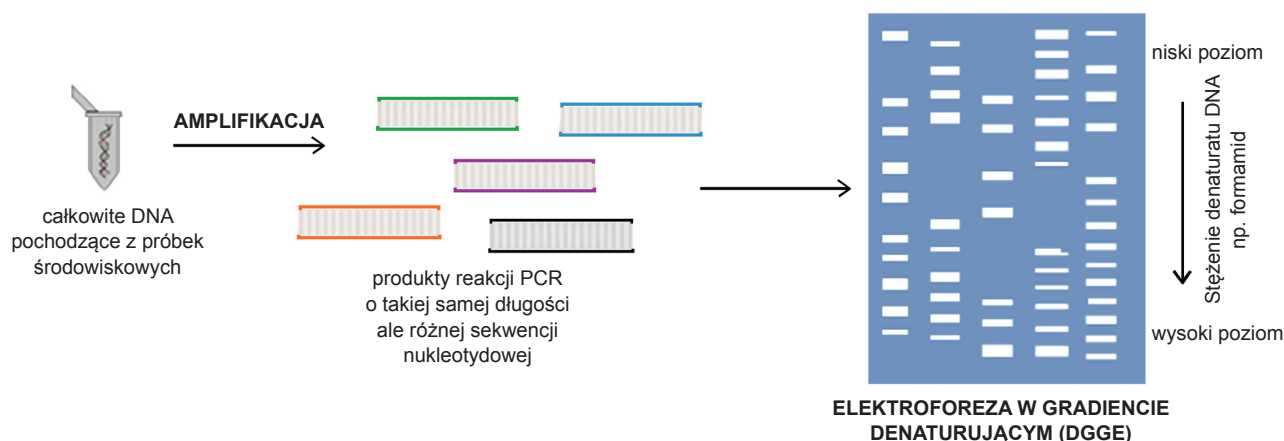
Gomes i wsp. [19] badali bakterijską różnorodność i dynamikę populacji w ryzosferze dwóch odmian kukurydzy (Nitroflint i Nitrodent) uprawianych na

glebach tropikalnych techniką elektroforezy TGGE opartej na analizie molekularnej genu 16S rRNA. Analiza DNA została wykonana z bezpośrednio pobranych próbek glebowych w trzech różnych etapach wzrostu roślin. Wyznaczono liczbę bakterii tlenowych. Wzory prążków najbardziej dominujących populacji bakterii były generowane przez technikę TGGE opartą o gen 16S rRNA powielony z całkowitego DNA przy udziale specyficznych dla eubakterii starterów. Aby zmniejszyć złożoność „odcisków palców” – „fingerprints” TGGE i analizować mniej liczne populacje, wykorzystano startery specyficzne dla różnych grup filogenetycznych (*α -Proteobacteria* i *β -Proteobacteria* oraz *Actinomycetales*). Porównanie wzorów TGGE wskazują, że różnorodność bakteryjna analizowana w różnych fazach wzrostu roślin dla obu odmian była podobna. Porównanie profili TGGE *α -* i *β -Proteobacteria* i promieniowców obu odmian potwierdziły tę obserwację. Profile TGGE odzwierciedlają silne zmiany sezonowe w populacji bakterii w ryzosferze, które mogą być również obserwowane z wzorów TGGE *α -* i *β -Proteobacteria* i w mniejszym stopniu dla promieniowców. Wzory prążków z ryzosfery młodych roślin wykazywały zmniejszoną złożoność. Sekwencjonowanie dominujących populacji wykazało, że na wszystkich etapach wzrostu roślin zidentyfikowano komórki bakterii z rodzaju *Arthrobacter*.

Technikę TGGE z amplifikacją PCR fragmentu 16S rDNA zastosowano również z powodzeniem do porównania populacji bakterii znajdujących się w ryzosferze i fyllosferze transgenicznego ziemniaka z ekspresją lizozymu T4 i nietransgenicznego rośliny ziemniaka. Wzory prążków TGGE fragmentów rDNA z ryzosfery były prawie identyczne dla rośliny transgenicznej i nietransgenicznej. W przeciwieństwie do tego, profile uzyskane z próbek z fyllosfery wykazywały mniejszy stopień złożoności, ale pokazywały dużo większe różnice pomiędzy roślinami [23–24, 54].

3. Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA, SSCP

Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), jest to tzw. technika „odcisków palca” – „fingerprinting” mająca na celu rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA o tej samej długości zgodnie z ich różnicami w ruchliwości, wywołanymi zmianami w strukturze drugorzędowej [5, 33]. Metoda ta umożliwia różnicowanie cząsteczek DNA o takiej samej długości, ale różnej sekwencji nukleotydowej [10]. Technika SSCP została opracowana w celu wykrywania znanych lub nowych polimorfizmów lub mutacji punktowych w DNA [10, 30, 35, 58]. Metoda PCR-



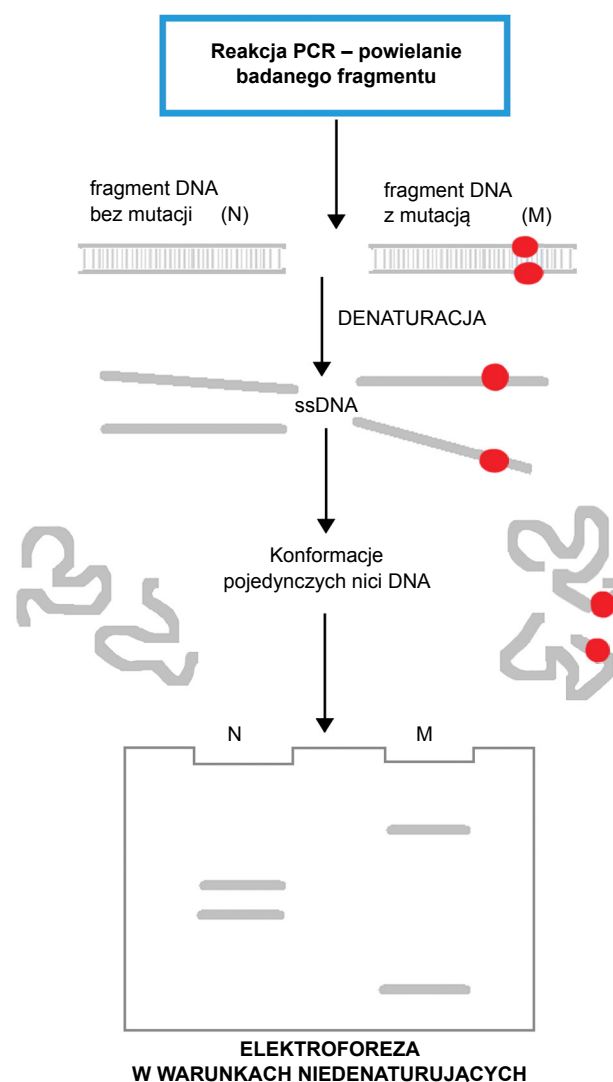
Rys. 1. Schemat techniki DGGE

Według [55], zmodyfikowano.

-SSCP zaliczana jest w biologii molekularnej do jednej z najczęściej używanych technik przesiewowych, dzięki której można ujawnić nieznanne mutacje w określonych genach [38]. Podstawą techniki PCR-SSCP jest denaturacja fragmentów DNA, czyli produktów PCR uzyskanych z zastosowaniem specyficznych starterów dla genu 16S rRNA, które następnie szybko się ochładza, przez co otrzymujemy jednoniciowe cząsteczki DNA – ssDNA. Bezpośrednio po ochładzaniu cząsteczki rozdzielane są drogą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach niedenaturujących (Rys. 2) [33, 35–36].

Rozdzielanie oparte jest na subtelnych różnicach w sekwencji (dotyczy często pojedynczych par zasad), co skutkuje zmianą złożonej struktury drugorzędowej, co z kolei prowadzi do widocznej różnicy w ruchliwości w żelu podczas elektroforezy [62]. Jednoniciowe cząsteczki DNA-ssDNA o takiej samej długości rozdzielane są na żelu poliakrylamidowym na podstawie różnic spowodowanych ich złożoną strukturą drugorzędową (zmianą konformacji) [10, 30, 33, 36, 38]. Gdy fragmenty DNA są jednakowej wielkości i nie ma substancji denaturującej, to ruchliwość elektroforetyczna będzie zależna od sekwencji nukleotydowej DNA [30, 35]. Fragmenty DNA o zmienionej konformacji (strukturze drugorzędowej) charakteryzują się inną mobilnością niż fragmenty, w których nie występuje mutacja [38]. Głównym ograniczeniem techniki SSCP jest fakt, że niektóre pojedyncze nici DNA mogą występować w więcej niż jednej stabilnej konformacji. W wyniku tego, ta sama sekwencja DNA może wytwarzać wiele prążków w żelu, reprezentujących więcej niż jeden zespół mikroorganizmów [10, 35, 76]. Dodatkowym utrudnieniem tej metody jest duża szybkość reannealingu nici DNA po początkowej denaturacji w czasie elektroforezy, który można usunąć przy zastosowaniu fosforylowanego startera w czasie reakcji PCR, a następnie zastosować specyficzne trawienie fosforylowanej nici przez egzonukleazę [62]. Metoda ta

cechuje się niskim stopniem różnicowania mikroorganizmów w porównaniu do np. AFLP – (Amplified Fragment Length Polymorphism) czy PFGE – (Pulsed-Field



Rys. 2. Schemat techniki PCR-SSCP

Na podstawie [5], zmodyfikowano.

Gel Electrophoresis). Ponadto, wielkość analizowanego produktu sięgająca tylko do 400 pz jest dodatkowym ograniczeniem tej metody [33].

Zalety techniki PCR-SSCP są podobne jak w technice DGGE/TGGE z dodatkową korzyścią, że nie wymagają zastosowania tzw. ogona GC, gradientowej budowy żeli poliakrylamidowych oraz specjalistycznej aparatury [5, 10, 30, 36, 62]. W związku z tym jest łatwiejszą techniką w porównaniu do DGGE [62]. Podobnie jak w metodzie DGGE, prążki DNA mogą być wycinane z żelu, wzmacniane i podawane sekwencjonowaniu. Jednakże, technika PCR-SSCP jest skuteczna tylko w przypadku małych fragmentów (pomiędzy 150 i 400 par zasad) [56, 62]. Technika ta charakteryzuje się również wysoką powtarzalnością w porównaniu do innych technik „odcisków palca” „fingerprinting” [33].

Smalla i wsp. [69] badali zbiorowiska bakteryjne w czterech glebach ornyc (gleba bielkowa, glina brunatna, piaszczysto ilasta i gliniasta). Analizy dokonano za pomocą technik należących do metod „odcisków palca” – „fingerprinting” – DGGE, TGGE oraz SSCP. Do badań użyto fragmenty genu 16S rRNA powielone z całkowitego DNA w czterech powtórzeniach dla każdego rodzaju gleby. Wszystkie metody doprowadziły do podobnych wniosków: (a) grupy „odcisków palca”, korelują z właściwościami fizyko-chemicznymi gleb, (b) występuje mała zmienność pomiędzy czterema powtórzeniami tej samej gleby, (c) wzory prążków bielkowych i gleb brunatnych są bardziej podobne do siebie, niż do pozostałych dwóch gleb, oraz (d) „odciski palców” różnych typów gleby, ujawniły istotne różnice w teście permutacji.

Badania Gasser i wsp. [17], potwierdzają hipotezę, że ryzosfera jest ciekawym rezerwuarem bakterii, które są producentami polihydroksyalkanianu. Niewiele wiadomo na temat ekologii bakterii produkujących polihydroksyalkanian. Aby uzyskać przegląd występowania i różnorodności bakterii produkujących polihydroksyalkanian występujących w mikrośrodkach roślinnych wyizolowano całkowite DNA mikroorganizmów pochodzące z różnych gatunków roślin (rzepak, rdest, oliwka, burak cukrowy, truskawka i winorośl) oraz od różnych mikrośrodków (fyllosfera, karposfera, ryzosfera i endosfera) i analizowano pod kątem występowania genów *phaC*. Do analizy występowania tej specyficznej grupy mikroorganizmów zastosowano technikę PCR-SSCP ze starterami specyficznymi dla genów kodujących *phaC*, kluczowego enzymu w syntezie polihydroksyalkanianu. Ponadto, analizy zostały potwierdzone poprzez ilościową reakcję PCR (qPCR – quantitative PCR). Wyniki pokazują, że występuje wysoki stopień specyficzności szczepów wobec roślin. Brak pozytywnych wyników dla mikrośrodków nadziemnych (fyllosfera i karposfera), natomiast w próbkach pochodzących z endo- i ryzosfery wykazano występowanie *phaC*.

Ryzosfera buraka cukrowego zawierała najwyższą liczbę szczepów z wynikiem pozytywnym. Poza tym, wykryto nowe gatunki bakterii wytwarzające polihydroksyalkanian, na przykład *Burkholderia terricola*, *Lysobacter gummosus*, *Pseudomonas extremaustralis*, *Pseudomonas brassicacearum* i *Pseudomonas orientalis*.

4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, Real-time PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym oparta jest na metodzie PCR opracowanej przez Kary'ego Mullis'a w 1980, która pozwala naukowcom na zamplifikowanie określonych fragmentów DNA ponad miliard razy [51–52, 78]. Metody oparte na technice PCR są bodźcem napędzającym biologię molekularną i ułatwiają badaczom manipulowanie DNA. PCR w czasie rzeczywistym stanowi kolejny skok technologiczny w biologii molekularnej, który stwarza nowe możliwości dla naukowców na całym świecie. Real-time PCR jest połączeniem ogromnej czułości reakcji PCR z dokładnością zapewnioną przez monitorowanie produktów PCR w czasie rzeczywistym [78]. W tradycyjnej technice PCR uzyskane produkty analizuje się w fazie stacjonarnej (fazie *plateau*) czyli po zakończeniu reakcji PCR. Na tym etapie reakcji ilości produktów PCR są zbliżone, mimo, że powstały w wyniku powielenia matryc, których wyjściowe stężenia były zróżnicowane. W fazie stacjonarnej brak proporcjonalnej zależności między stężeniem produktu reakcji PCR, a ilością kopii amplifikowanej sekwencji matrycowej. W związku z tym ten etap nie daje możliwości dokładnego wyznaczenia wyjściowej ilości sekwencji matrycowej. Wykorzystanie metody PCR do analiz ilościowych wymaga zastosowania takiego etapu reakcji, w którym zostanie utrzymana liniowa zależność między ilością kopii amplifikowanej sekwencji DNA, a wyznaczonymi parametrami kinetycznymi reakcji PCR. Określenie tych parametrów wymaga użycia technik umożliwiających dokładne śledzenie przebiegu reakcji PCR [43, 70]. PCR w czasie rzeczywistym rozwiązuje ten problem przez wykorzystanie faktu, że wydajna amplifikacja DNA występuje na wczesnym etapie procesu reakcji i w związku z tym pomiar otrzymanego produktu następuje w fazie wykładniczej [78].

Na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia Higuchi i wsp. [26] w Roche Molecular Systems i Chiron po raz pierwszy zademonstrowali reakcje PCR w czasie rzeczywistym. Do mieszaniny reakcyjnej PCR dodano typowy barwnik fluorescencyjny o nazwie bromek etydyny (EtBr), który interkaluje do dwuniciowego DNA. Fluorescencja bromku etydyny zwiększa się w wyniku związania go z kwasami nukleinowymi. Reakcja prowadzona była w świetle ultrafioletowym

(UV), które powoduje fluorescencję EtBr, a za pomocą kamery wideo sprzężonej z komputerem prowadzona była wizualizacja gromadzącego się DNA [49, 70, 78]. Pod wpływem światła UV bromek etydyny wbudowany w dwuniciowe DNA fluoryzuje, a intensywność świecenia w kolejnych cyklach reakcji wzrasta wraz ze stężeniem amplikonu [43, 70]. W związku z tym możliwe było monitorowanie zmian stężenia produktu w mieszaninie reakcyjnej PCR podczas trwania reakcji [6, 78]. Następnie, technologia ta szybko stała się konkurencyjna w stosunku do innych metod i powszechnie stosowana [78]. PCR w czasie rzeczywistym odnosi się po prostu do amplifikacji DNA (PCR), która jest monitorowana. Pozwala ona badaczowi lepiej określić ilość wyjściowego DNA w próbce przed amplifikacją metodą PCR [78]. PCR w czasie rzeczywistym jest metodą „zbierania danych” w trakcie procesu PCR, łącząc w ten sposób amplifikację i detekcję w jednym kroku [85]. W reakcji real-time PCR dwuniciowe sekwencje DNA amplifikowane są gwałtownie, gdy wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej są świeże i dostępne.

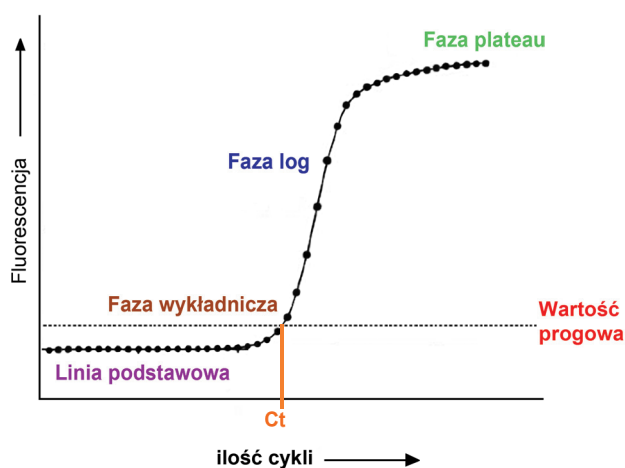
Krzywa kinetyczna reakcji rozpoczyna się od linii podstawowej, a następnie przechodzi do fazy wykładniczej amplifikacji, a następnie przez liniową fazę (zwaną także fazą *log*) i ostatecznie kończy się fazą *plateau* [61, 75, 84–85]. Podczas liniowej fazy (zwykle pierwszych 10–15 cykli) reakcja PCR dopiero się zaczyna, a emisja fluorescencji jest niska. W tym czasie wyznaczana jest tzw. fluorescencja tła (background). We wczesnej fazie wykładniczej intensywność fluorescencji rośnie, ponieważ zwiększa się ilość powstających produktów [43, 70, 85]. Fluorescencja osiąga wartość progową (F_t , fluorescence threshold) tzn. jest ona znacznie większa niż poziom tła, zwykle $10 \times$ odchylenie standardowe (SD) od linii podstawowej (wielokrotność odchylenia standardowego tła) [74, 77]. Cykl, w którym to następuje znany jest w literaturze jako C_t – cykl progowy (C_t , threshold cycle) lub C_p – punkt graniczny, (C_p , crossing point). Wartość progowa jest reprezentatywna dla wyjściowej liczby kopii w oryginalnej matrycy i jest używana do obliczania wyników doświadczalnych. Im więcej kopii amplifikowanych sekwencji DNA znajduje się na początku reakcji, tym mniej cykli potrzeba, żeby intensywność fluorescencji przekroczyła poziom tła [21, 70, 77, 85]. Podczas fazy *log*-liniowej, PCR osiąga optymalną amplifikację w idealnych warunkach reakcji. Natomiast w etapie *plateau*, następuje ograniczenie składników reakcji, a intensywność fluorescencji spada (Rys. 3) [4, 85].

Bezwzględne oznaczenie ilościowe wymaga zastosowania seryjnych rozcieńczeń standardów o znanych stężeniach, w celu wygenerowania krzywej wzorcowej. Krzywą standardową tworzy liniowa zależność pomiędzy C_t i początkowa ilość całkowitego cDNA, co pozwala na określenie stężenia niewiadomych prób na

podstawie ich wartości C_t [21, 85]. Metoda ta zakłada, że wszystkie standardy i próbki mają w przybliżeniu równą efektywność amplifikacji [85]. Ponadto, stężenia rozcieńczeń standardów powinny obejmować poziomy zakresów łatwych do wyliczenia i wykrywalnych w specyficznym urządzeniu do real-time PCR [85].

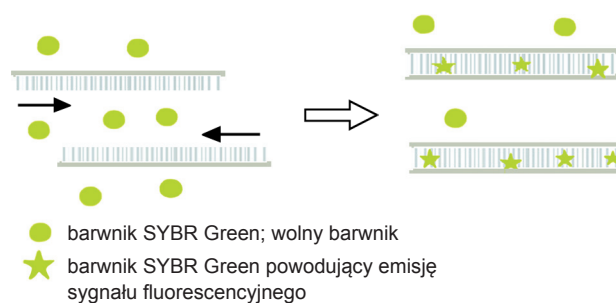
Kluczem w reakcji Real-time PCR jest zdolność do monitorowania przebiegu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Jest to realizowane dzięki szczególnej chemicznej detekcji [78]. Ogólnie, chemiczne detektory dzielimy na specyficzne i niespecyficzne [68]. Zastosowanie niespecyficznych cząsteczek fluorescencyjnych jest stosunkowo prostą techniką. Opiera się ona na wiązaniu barwników, np. SYBR Green czy wspomniany bromek etydyny, które interkalują pomiędzy dwie sąsiadujące pary zasad w cząsteczce podwójnej nici DNA, zniekształcając strukturę podwójnej helisy [47, 65]. Barwnik związany z DNA powoduje emisję sygnału fluorescencyjnego, natomiast barwnik znajdujący się w roztworze (to znaczy, że barwnik nie jest związany z DNA; wolny barwnik), charakteryzuje się niską fluorescencją [68, 71]. SYBR Green fluoryzuje 50 razy jaśniej niż bromek etydyny, gdy jest związany z podwójną nicią DNA. W miarę postępu reakcji PCR, następuje zwiększenie ilości SYBR Green, który wiążąc się do dwuniciowego amplikonu, daje wzrost fluorescencji, która z kolei jest proporcjonalna do stężenia produktu (Rys. 4) [49, 71].

Wzrost sygnału fluorescencyjnego jest spowodowany przez wszystkie powielone produkty DNA powstałe podczas reakcji, które niekoniecznie są specyficzne dla pożądanego produktu. Przy użyciu tej metody, startery muszą być starannie dobrane, a reakcja PCR zoptymalizowana tak, aby uniknąć tworzenia produktów nieswoistych np. dimery starterów [68, 70–71]. Spośród dostępnych chemicznych metod detekcji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, zastosowanie barwników interkalujących jest najmniej kosztowne, nie wymaga syntezy specyficznych sond docelowych, i może być wykorzystywany z każdą parą starterów do mierzenia dowolnego genu. Tak więc, jest on szczególnie użyteczny w opracowywaniu analizy Real-time PCR, gdy znane są startery potrzebne do wytworzenia pojedynczego produktu z wysoką wydajnością (pośród dostępnych do wykrywania chemicznych PCR w czasie rzeczywistym, jest to najmniej kosztowne, a nie wymaga syntezy sondy i może być używany z dowolną parą starterów. Tak więc, jest on szczególnie użyteczny w opracowywaniu testu ilościowego w czasie rzeczywistym, gdy startery są już dostępne, które są znane do wytworzenia pojedynczego produktu z wysoką wydajnością [69, 71–72]. Innymi opisanymi specyficznymi barwnikami wiążącymi się do dsDNA są np. BEBO, YOYO-1, TOTO-1, itd. jednak nie są szeroko stosowane [78].



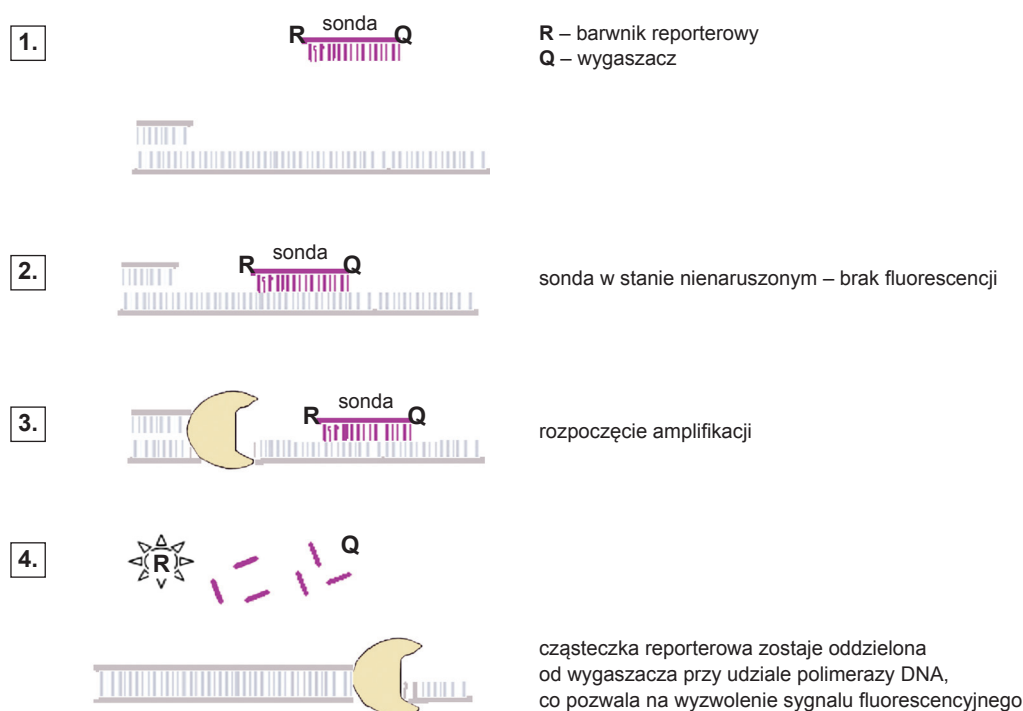
Rys. 3. Wykres fluorescencji w zależności od cyklu Real-time PCR. Przedstawiono fazy reakcji na podstawie [80–81], zmodyfikowano.

W celu zapewnienia, zwiększenia sygnału fluorescencyjnego, zwiększenia czułości i specyficzności monitorowania przebiegu amplifikacji w czasie rzeczywistym można zastosować hybrydację fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych. Ustanowienie tego rodzaju analizy będzie bardziej czasochłonne i pracochłonne, ale dla przeprowadzanych badań będzie to miało pozytywny wpływ [68]. Jedną z najczęściej stosowanych strategii jest zastosowanie sond molekularnych np. typu TaqMan [68]. Pod względem struktury sondy to jednoniciowe oligonukleotydy, które są podwójnie znakowane. Sonda na końcu 5' jest reporterem fluorescencyjnym (barwnik fluorescencyjny), natomiast koniec



Rys. 4. Schemat przedstawiający emisję sygnału fluorescencyjnego po związaniu się barwnika SYBR Green do dwuniciowego DNA. Na podstawie [66], zmodyfikowano.

3' zawiera przyłączony wygaszacz [43, 68, 70, 78]. Jeśli sonda jest w stanie niezhybrydowanym, wygaszacz i reporter są blisko siebie tzn., że są przyłączone do tego samego krótkiego oligonukleotydu to wygaszacz absorbuje fluorescencję reportera i nie zostanie wykryty żaden sygnał [70, 78]. Jest to przykład fluorescencyjnego transferu energii rezonansowej (zwane również jako transfer Förster), w którym energia przekazywana jest od „dawcy” – reporter do „biorcy” – wygaszacz [43, 70]. Podczas amplifikacji sonda oligonukleotydowa jest degradowana przez polimerazę DNA mającą aktywność 5'-egzonukleazową, przez co cząsteczka reporterowa jest oddzielona od wygaszacza co pozwala na wyzwolenie sygnału fluorescencyjnego [68, 78]. Przykładowymi fluorochromami wygaszającymi są TAMRA, DABCYL i BHQ, natomiast wśród barwników reporterowych można wyróżnić FAM, VIC, NED, TET itd. (Rys. 5) [78].



Rys. 5. Schemat przedstawiający analizę molekularną Real-time PCR z wykorzystaniem sondy typu TaqMan. Według [66, 70, 84] zmodyfikowano.

Bakteryjne wędnięcie lucerny (*Medicago sativa*), spowodowane przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (Cmi) jest ważną chorobą lucerny występującą na całym świecie. Patogen ten pochodzi z Ameryki Północnej, a teraz pojawia się także w wielu innych krajach, Ameryki Południowej, Azji, Afryki i Oceanii [46]. Diagnoza zakażenia Cmi jest trudna, często bywa oceniana na podstawie objawów bakteryjnego wędnięcia, jednak może być mylona z innymi chorobami [46] lub uszkodzeniami spowodowanymi herbicydami. Dlatego ważne było zastosowanie szybkiej metody diagnostycznej potwierdzającej obecność patogenu. Dotychczas stosowane metody wykrywania i identyfikacji tego patogenu polegały na klasycznych badaniach bakteriologicznych [46] lub badaniach serologicznych [31]. Celem badań Marfeat i wsp. [46] była ocena próby identyfikacji Cmi metodą PCR oraz opracowanie testu real-time PCR do wykrywania i ilościowego oznaczania Cmi w DNA ekstraktach z roślin. Prowadzone analizy opierały się na międzygenowym regionie ITS (Internal Transcribed Spacer) występującym pomiędzy genami 16S i 23S rRNA. Badaniom poddano DNA pochodzące z zakażonych i niezakażonych roślin lucerny. Wyniki wskazują, że technika PCR w czasie rzeczywistym jest obecnie rutynowo stosowana do monitorowania bakteryjnego wędnięcia roślin lucerny oraz w celu potwierdzenia występowania tożsamości kultur Cmi. Jest to przydatne narzędzie badawcze w badaniach epidemiologicznych patogenów, przyczyniające się do lepszego kontrolowania choroby.

Saragih i wsp. [67] użyli ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) – jako narzędzia do wykrywania i identyfikacji *Cordyceps militaris* w glebie. *Cordyceps militaris* jest grzybem entomopatogenym, który atakuje larwy i poczwarki motyli w różnych środowiskach np. w ściółce liści lub górnych warstwach gleby. Spośród ośmiu par starterów, para starterów CM2946F i CM3160R, temperatura wydłużania wynosząca 65°C oraz liczba cykli równa 60 to najlepsze połączenie starterów i warunków, gdyż tylko takie połączenie wykazało specyficzność objawiającą się z pojedynczym pikiem krzywej topnienia w qPCR. W wyniku reakcji otrzymano jeden produkt o wielkości 167 par zasad i przy zastosowaniu programu BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) określono podobieństwo sekwencji, wskazując na 99% stopień pokrewieństwa genomowego z *C. militaris*. Sposób ten wydaje się skuteczny w wykrywaniu *C. militaris* w glebie i użyteczny do szybkiego i niezawodnego ilościowego oznaczania tej bakterii w różnych ekosystemach.

W glebie występuje kosmopolityczny grzyb, *Thielaviopsis basicola*, który powoduje choroby w wielu uprawach rolnych np. w Chinach jest czynnikiem sprawczym czarnej zgnilizny na roślinach tytoniu. Wczesna diagnoza i wykrycie patogena w glebie są

niezbędne do kontrolowania tej choroby w warunkach polowych. Celem badań Huang i Kang [27] było opracowanie skutecznych i czułych metod, nadających się do wykrywania na dużą skalę *T. basicola*. W celu szybkiego i specyficznego wykrywania i oznaczania *T. basicola* zastosowano analizę real-time PCR. W oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentu ITS *Thielaviopsis spp.*, zaprojektowano startery i sondy typu TaqMan. Łącząc test qPCR z wydajnym protokołem izolacji DNA można osiągnąć wysoki poziom detekcji. Taka analiza pozwala na wykrycie *T. basicola* w glebie w ciągu 4–5 godzin, a zanotowana granica wykrywalności wynosi 3 zarodniki na reakcję qPCR.

W ważnych ekonomicznie uprawach występuje *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Bakteria ta jest endofitycznym diazotrofej, który promuje wzrost i rozwój roślin. Biorąc pod uwagę, że obecnie konieczne jest opracowanie szybkich metod monitorowania interakcji roślina-bakteria, celem badań Pereira i wsp. [60] było opracowanie metody PCR w czasie rzeczywistym do ilościowego oznaczania PGPB *H. seropedicae* w ryzosferze siewek kukurydzy. W tym celu zostały zaprojektowane odpowiednie pary starterów a ich specyficzność została zweryfikowana poprzez zastosowanie materiału genetycznego DNA pochodzącego z 12 różnych gatunków bakterii. Test za pomocą qPCR ze starterami HERBAS1 i HERBAS2 zastosowano do wykrywania i ilościowego oznaczenia szczepu *H. seropedicae* SmR1 w zaszczepionych korzeniach kukurydzy hodowanej *in vitro* w doniczkach. Materiał do badań zbierany był 1, 4, 7 i 10 dni po zaszczepieniu. Szacunkowa liczba kopii DNA bakterii na gram korzeni w przypadku roślin uprawianych w warunkach *in vitro* wynosiła około 10⁶. Test z użyciem starterów HERBAS1 i HERBAS2 może być użyteczny do monitorowania interakcji roślina – bakterii *H. seropedicae* SmR1.

5. Podsumowanie

Najbogatszym rezerwuarem mikroorganizmów jest środowisko naturalne ze szczególnym uwzględnieniem ekosystemu glebowego i roślinnego. Gleba i rośliny to wysoce złożone i bogate pod względem liczebności i różnorodności mikroorganizmów środowiska. Mikroorganizmy zasiedlające glebę odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących w glebie. Różnorodność i struktura zbiorowisk mikroorganizmów glebowych mają szczególne znaczenie dla funkcjonowania gleb. Mikroorganizmy zasiedlające powierzchniowe lub wewnętrzne tkanki roślin często pozytywnie wpływają na ich rozwój, przykładem może być wiązanie azotu atmosferycznego, poprawa nabycia składników odżywczych, ograniczenie infekcji patogenów roślinnych. Niewątpliwie

ważnym aspektem badań mikrobiologicznych jest dobór i opracowanie wskaźników do oceny i kształtowania bioróżnorodności mikrobiologicznej środowiska glebowego i roślinnego. Obecnie analiza różnorodności biologicznej mikroorganizmów zasiedlających dane środowiska głównie opiera się na badaniach z zakresu biologii molekularnej. Są to metody szybkie, czułe i powtarzalne. Warto wspomnieć, że dają one możliwość bezpośredniej oceny mikroorganizmów bez konieczności ich hodowli. Techniki DGGE/TGEE, SSCP i Real Time PCR są jednymi najczęściej wykorzystywanych metod genetycznych wykorzystywanych do oceny bioróżnorodności.

Publikacja została opracowana w ramach realizacji zadania 1.4 Programu Wieloletniego IUNG-PIB na lata 2016–2020.

Piśmiennictwo

- Adhitya A., Thomas F.I.M., Ward B.B.: Diversity of assimilatory nitrate reductase genes from plankton and epiphytes associated with a seagrass bed. *Microbial Ecol.* **54**, 587–597 (2007).
- Andreote F.D., Azevedo J.L., Araújo W.A.: Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 417–432 (2009)
- Brons J.K., van Elsas J.D.: Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries, as Influenced by Different Reverse Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2717–2727 (2008)
- Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–193 (2000)
- Cetecioglu Z., Ince O., Ince B.: Gel Electrophoresis Based Genetic Fingerprinting Techniques on Environmental Ecology (w) Gel electrophoresis – advanced techniques, red. S. Magdeldin, Rijeka, Croatia, 2012, s. 51–66
- Cleary T.J., Roudel G., Casillas O., Miller N.: Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4783–4786 (2003)
- Da Silva K.R.A., Salles J.F., Seldin L., van Elsas J.D.: Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J. Microbiol. Meth.* **54**, 213–231 (2003)
- Dorigo U., Volatier L., Humbert J.F.: Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* **39**, 2207–2218 (2005)
- Duelli P., Obrist M.K.: Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* **98**, 87–98 (2003)
- Fakruddin M., Mannan K.S.B.: Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon J. Sci. (Biol. Sci.)* **42**, 19–33 (2013)
- Fischer S.G., Lerman L.S.: DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1579–1583 (1983)
- Fischer S.G., Lerman L.S.: Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**, 191–200 (1979)
- Fjellbirkeland A., Torsvik V., Ovreas L.: Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxhF* and 16S rDNA sequences. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **79**, 209–217 (2001)
- Gałązka A., Gałązka R.: Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Pol. J. Microbiol.* **64**, 239–250 (2015)
- Gałązka A., Król M., Perzyński A.: The Efficiency of Rhizosphere Bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in Soils Freshly Contaminated with PAHs and Diesel Fuel. *Pol. J. Environ. Stud.* **21**, 345–353 (2012)
- Garbeva P., van Veen J.A.; van Elsa, J.D.: Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 51–64 (2004)
- Gasser I., Muller H., Berg G.: Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**, 142–150 (2009)
- Głowaciński Z. Różnorodność gatunkowa – jej interpretacja i obliczanie. W: Różnorodność biologiczna: pojęcia, oceny, zagadnienia ochrony i kształtowania, *Zeszyty Naukowe Komitetu „Człowiek i Środowisko”*, **15**, 57–70 (1996)
- Gomes N. C. M., Heuer H., Schönfeld J., Costa R., Mendonça-Hagler L., Smalla K.: Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.* **232**, 167–180 (2001)
- Harper J.L., Hawksworth D.L.: Biodiversity: measurement and estimation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **345**, 5–12 (1994)
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994 (1996)
- Henckel T., Friedrich M., Conrad R.: Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1980–1990 (1999)
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H.: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–3241 (1997)
- Heuer H., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities (w) *Modern Soil Microbiology*, red. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington, Marcel Dekker, New York. 1997, s. 353–373
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H.: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–3241 (1997)
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026–1030 (1993)
- Huang J., Kang Z.: Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative PCR assays. *Microbiol. Res.* **165**, 411–417 (2010)
- Ji S.C., Kim D., Yoon J.H., Lee C.H.: Metagenomic Analysis of BTEX-Contaminated Forest Soil Microcosm. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 668–672 (2007)
- Kembel S.W., O'Connor T.K., Arnold H.K., Hubbell S.P., Wright S.J., Green J.L.: Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *PANS*, **111**, 13715–13720 (2014)

30. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* **58**, 169–188 (2004)
31. Kokoskova B., Pankova I., Krejzar V.: Characteristics of polyclonal antisera for detection and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Plant Protect. Sci.* **36**, 46–52 (2000)
32. Krajowa strategia ochrony i zrównoważonego użytkowania różnorodności biologicznej wraz z Programem działań na lata 2007–2013. Załącznik do uchwały nr 270/2007 Rady Ministrów z dnia 26.10.2007
33. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Postęp. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
34. Kucharska K., Wachowska U.: Mikrobiom roślin uprawnych. *Post. Mikrobiol.* **53**, 4: 352–359 (2014)
35. Kumar R., Joshi S.R.: Microbial Ecology of Soil: Studying the diversity of microorganisms in the most complex of the environments – A review. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 267–279 (2015)
36. Lee D.H., Zo Y.G., Kim S.J.: Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single strand conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3112–3120 (1996)
37. Leys N.M.E., Ryngaert A., Bastiaens L., Verstraete W., Top E.M., Springael D.: Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *App. Environ. Microbiol.* **70**, 1944–1955 (2004)
38. Libczyńska A., Woźniak A., Wawrocka A., Krawczyński M.R.: Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jednogenowych. *Nowiny Lekarskie*, **75**, 486–490 (2006)
39. Łyszcz M., Gałązka A.: Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Kosmos, Varia*; no **2**, 2017 (w druku)
40. Łyszcz M., Gałązka A.: Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 309–319 (2016)
41. Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 155–165 (2001)
42. Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 155–165 (2001)
43. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1292–1305 (2002)
44. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C.: Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *App. Environ. Microbiol.* **65**, 3566–3574 (1999)
45. Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R.: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* **34**, 265–276 (2008)
46. Marefat A., Ophel-Keller K., McKay A.: A real-time PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* in Lucerne. *Australas. Plant. Path.* **36**, 262–269 (2007)
47. Miller K.M., Ming T.J., Schulze A.D., Withler R.E.: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques*, **27**, 1016–1030 (1999)
48. Milling A., Smalla K., Maidl F.X., Schloter M., Munch J.C.: Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant Soil*, **266**, 23–39 (2004)
49. Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*, **24**, 954–958 (1998)
50. Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J.C., Joint I.: Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* **2**, 379–392 (2008)
51. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* **155**, 335–350 (1987)
52. Mullis K.B.: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* **262**, 56–61, (1990)
53. Muyzer G., Brinkhoff T., Nubel U., Santegoeds C., Schafer H., Wawer C.: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology (w) *Molecular Microbial Ecology Manual*, red. A. Kowalchuk, F.J. de Bruijn., A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 2004, s. 743–769
54. Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw.* **73**, 127–141 (1998)
55. Muyzer G., Waal E.C.D., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**, 695–700 (1993)
56. Muyzer, G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322 (1999)
57. Nakatsu C.H.: Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am.* **71**, 562–571 (2007)
58. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.: A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics.* **5**, 874–879 (1989)
59. Peixoto R.S., Coutinho H.L.D., Rumjanek N.G., Macrae A., Rosado A.S.: Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 316–320 (2002)
60. Pereira T.P., Do Amaral F.P., Dall’Asta P., Brod F.C.A., Aris A.C.M.: Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. *Mol. Biotechnol.* **56**, 660–670 (2014)
61. Rao X., Lai D., Huang X.: A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *J. Comput. Biol.* **20**, 703–711 (2013)
62. Rastogi G., Sani R.K.: Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment (w) *Microbes and Microbial Technology Agricultural and Environmental Applications*, red. I. Ahmad, F. Ahmad, J. Pichtel, Springer Science+Business, New York Dordrecht Heidelberg London. 2011, s. 29–57
63. Rincon-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M.: Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. *Diversity*, **5**, 581–612 (2013)
64. Rosado A.S., Duarte G.F., Seldin L., Van Elsa J.D.: Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2770–2779 (1998)
65. Rosenbaum V., Riesner D.: Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chemist.* **26**, 235–246 (1987)
66. Salles J.F., De Souza F.A., van Elsas J.D.: Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1595–1603 (2002)
67. Saragih S.A., Takemoto S., Hisamoto Y., Fujii M., Sato H., Kamata N.: Quantitative real-time PCR (qPCR) – Based tool for detection and quantification of *Cordyceps militaris* in soil. *J. Invertebr. Pathol.* **124**, 70–72 (2015)

68. Sluijter J.P.G., Pasterkamp G., de Kleijn D.P.V.: Quantitative Real-Time PCR (w) Cardiovascular Research New Technologies, Methods, and Applications, red. G. Pasterkamp, D. de Kleijn, Springer, New York, 2005, 75–83
69. Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C.C.: Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results. *J. Microbiol. Methods*. **69**, 470–479 (2007).
70. Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia*. **1**, 71–85 (2008)
71. Sugden D., de Winter P.: Quantification of mRNA Using Real Time RT-PCR (w) Molecular Biomethods Handbook, red. J.M. Walker, R. Rapley, Humana Press, Totowa, NJ, 2008, s. 149–168
72. Sugden D.: Quantitative PCR (w) Medical BioMethods Handbook, red. J.M. Walker, R. Ralph, Humana Press, New York, 2005, s. 327–345
73. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crc. Cr. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57, (2000)
74. Tichopad A., Didier A., Pfaffl M.W.: Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell. Probes*. **18**, 45–50 (2004)
75. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W.: Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* **3**, 1–6 (2003)
76. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil. Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
77. Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia*, **1**, 86–96 (2008)
78. Valasek M.A., Repa J.R.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159 (2005)
79. Valášková V., Baldrian P.: Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant. Soil. Environ.* **55**, 10, 413–423 (2009)
80. Vallaeys T., Topp E., Muyzer G., Macheret V., Laguerre G., Soulas G.: Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**, 279–285 (1997)
81. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M.: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. **44**, 619–626 (2008)
82. Vendan R.T., Lee S.H., Yu Y.J., Rhee Y.H.: Analysis of Bacterial Community in the Ginseng Soil Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Indian J. Microbiol.* **52**, 286–288 (2012)
83. Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S., Di Giovanni G.D.: A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2545–255 (1998)
84. Wilhelm J., Pingoud A.: Real-time polymerase chain reaction. *Chem. Biochem.* **4**, 1120–1128 (2003)
85. Wong M.L., Medrano J.F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. **39**, 75–85 (2005)
86. Yang C.H., Crowley D.E., Borneman J., Kee N.T.: Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3889–3894 (2001)
87. Ziemińska-Buczyńska A., Cema G., Kalbarczyk M., Żabczyński S.: Wykorzystanie metody PCR-DGGE do badania zmienności genotypowej bakterii zasiedlających złoża tarczowe oczyszczające modelowe ścieki koksownicze. *Ochr. Śr.* **36**, 3–8 (2014)