

Vybrané metody používané při výzkumu jemných kořenů a ektomykorhiz

Cudlín P., Holub F., Vašutová M., Chmelíková E.

Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

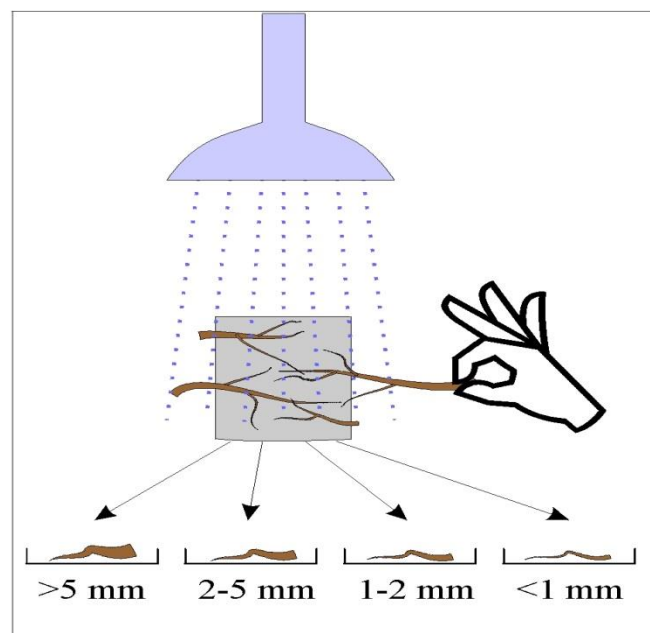
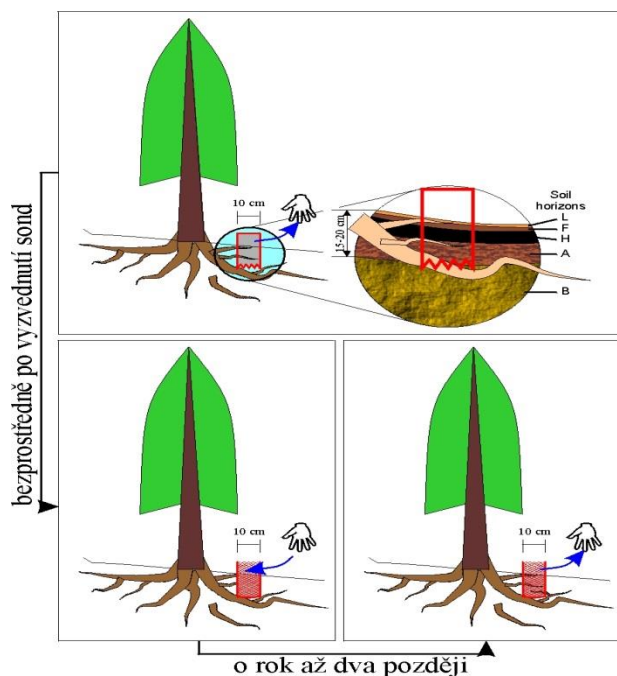
Mendelova
univerzita
v Brně



Obsah

- Biometrická měření jemných a hrubých kořenů
- Kolonizace houbovým symbiontem
- Sledování vývoje ektomykorhiz
- Zjišťování biodiverzity ektomykorhizních (ECM) symbiontů

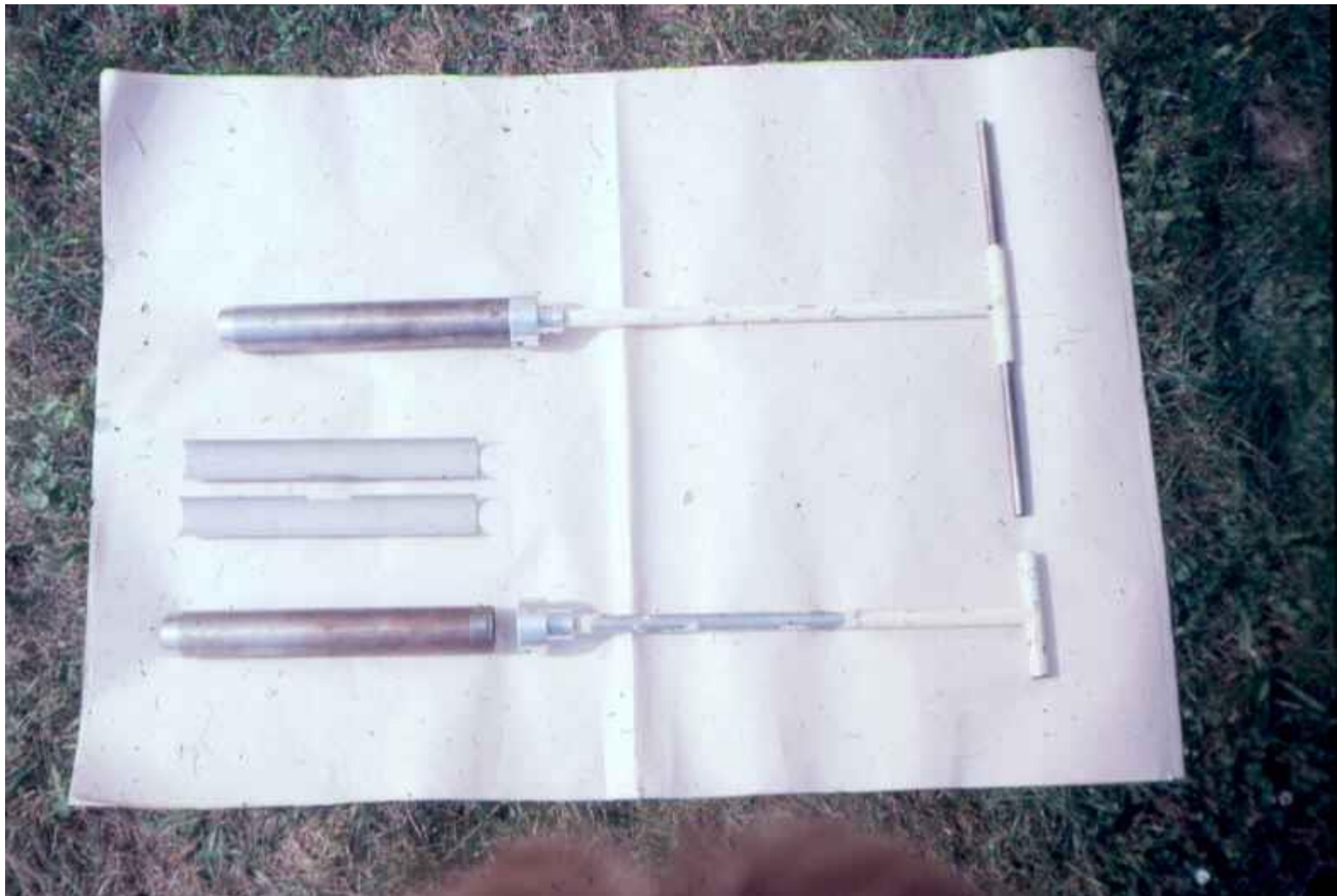
Biometrická měření jemných a hrubých kořenů



Obr. 6.1. Schéma zakládání sáčků kořenů.

Obr. 6.2. Schéma extrakce z půdy a třídění pro vrůstání kořenů.

- Kořeny se vyzvednou z půdy, promyjí a oddělí se od nich dlouhé mrtvé kořeny s mrtvými kořenovými špičkami.



Sonda na odběr půdy a kořenů o průměru 6 cm.

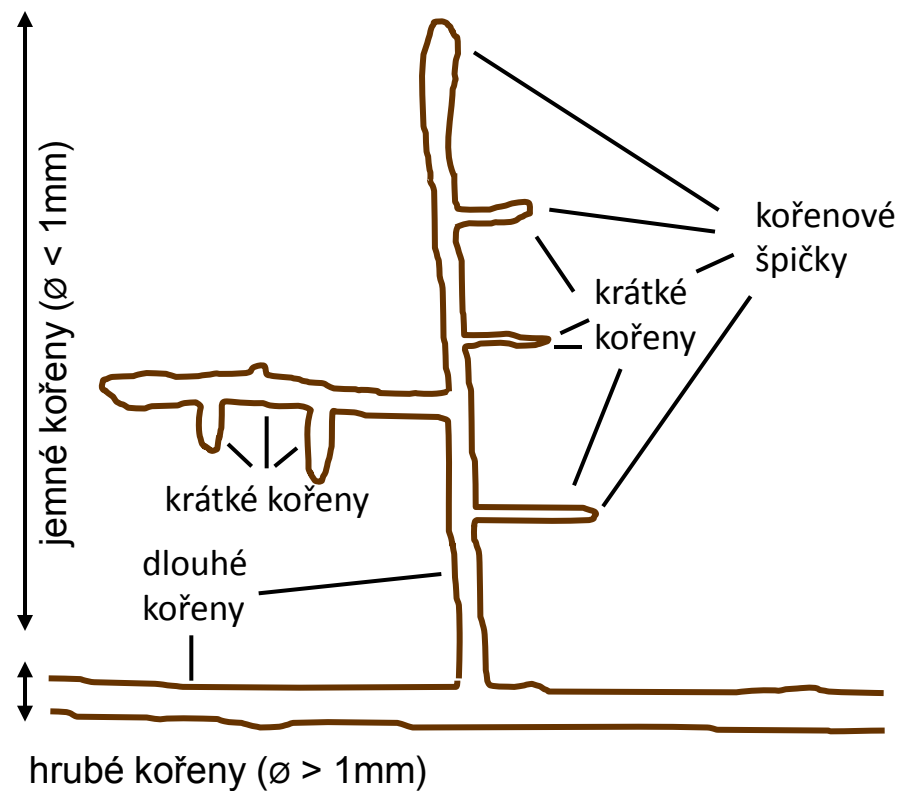
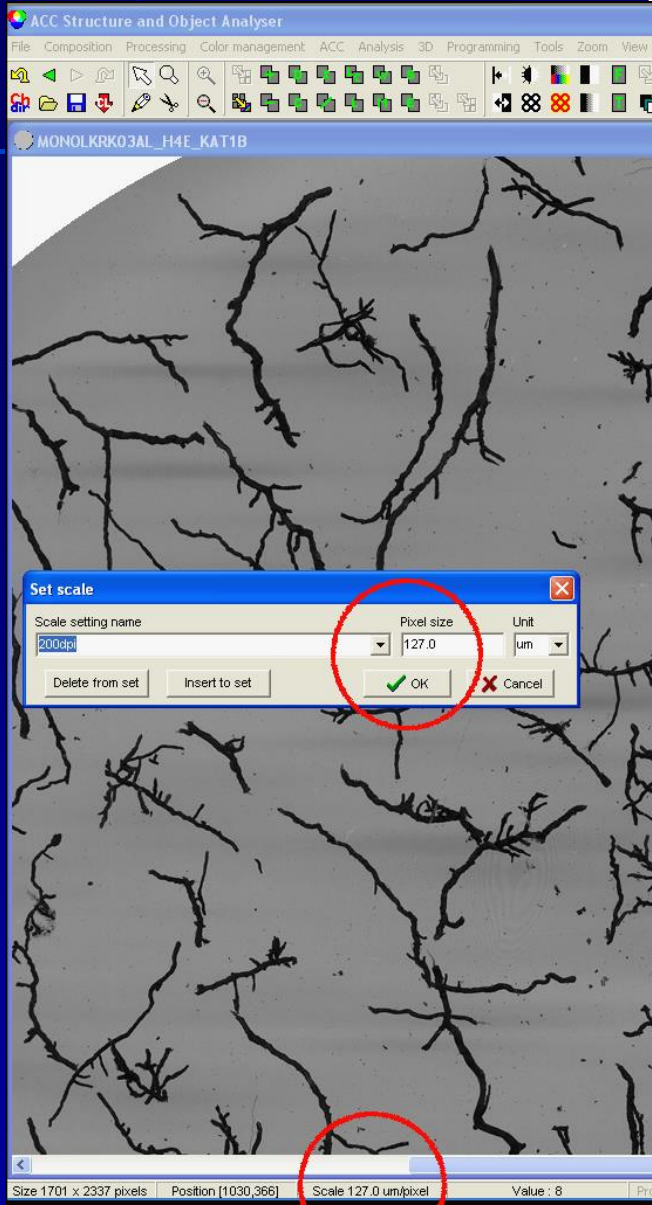


Schéma klasifikace nejvyšších řádů kořenového systému ektomykorhizních dřevin (jemných, hrubých, krátkých a dlouhých kořenů)

- **Tloušťka** - tloušťku kořenů uvádíme v tloušťkových kategoriích; jemné kořeny u smrku ztepilého jsou v kat. I (<1 mm), u borovice lesní v kat. II (1-2 mm)
 - **Délka** - dá se měřit pomocí Průsečkové metody v Petriho misce nebo pomocí analýzy obrazu (AO)
 - **Plocha** – dá se zjistit pouze pomocí AO
 - **Počet rozvětvení** - lze stanovit počítáním pod binolupou nebo AO
 - **Hmotnost sušiny** – suší se 12 hodin při 50 C; lze vážit celkovou biomasu kořene nebo roztrždit na živé a mrtvé kořeny a do tloušťkových kategorií.
 - **Počet špiček** - lze stanovit počítáním pod binolupou nebo AO; lze počítat špičky živé a mrtvé, mykorhizní a nemykorhizní nebo podle zařazení do kategorií vývoje mykorhizní symbiózy a třídy vitality špičky
-
- I když je v současné době ve světě nejpoužívanějším programem pro automatické měření kořenů program WinRhizo od firmy Regent Instruments Inc. z Kanady, (http://www.regentinstruments.com/assets/winrhizo_about.html), lze u nás doporučit domácí program ACC (Adaptive Contrast Control, SOHO, s.r.o. Brno)(Gronský et al. 2005).

Protokol pracovního postupu zpracování obrazu v obrazovém analyzátoru ACC, měření kořenových délek a počtů špiček



1. Výchozím zdrojem dat pro obrazový analyzátor ACC jsou snímky kořenových systémů
2. Vložení měřítka – kalibrace obrazu

Panel nástrojů obrazového analyzátoru ACC, procedura Set scale, zvýrazněno je zadávání délky jednoho obrazového bodu a informace o měřítku v obraze (dole uprostřed), na pozadí je snímek kořenového systému na Petriho misce.

Root analysis

Overlay

k3

Predefined parameters

New

Delete

Set

Attributes

Parameters

Analyze

Select all

Unselect all

Image size: 216.0 x 296.8 mm

X = 56.388

Y = 182.245

Root analysis parameters setting



Basic parameters

- Length
 Area
 Volume
 Surface

Endings

- Number of endings

Sensitivity [%] 27.0

Size of endings

Min 3 Max 5

k3

Load

Save

Cancel

OK

Histogram

- Active

Number of classes 6

Automatically defined classes

- User's defined classes

from 0.127 to 1.016

from 1.143 to 2.032

from 2.159 to 3.048

from 3.175 to 4.191

from 4.318 to 5.207

from 5.461 to 15.494

 Pixels Units mm

3. Výběr procedury

4. Výběr parametrů pro nastavení procedury Root analysis

5. Výběr nastavení pracovní vrstvy

6. Nastavení parametrů měření

Panel nástrojů procedury Root analysis obrazového analyzátoru ACC, rozvinutá procedura Root analysis parameters setting, červeně jsou zvýrazněny povinné procedury, na pozadí je snímek pracovní vrstvy kořenového systému na Petriho misce.

Root analysis

Root analysis

Overlay: k3

Predefined parameters

New Delete

Set Attributes

Parameters Analyze

Select all Inselect all

Image size = 216.0 x 296.8 mm

X = 49.403 Y = 152.527

< 0.127 ; 1.016 > :	
< 1.143 ; 2.032 > :	
< 2.159 ; 3.048 > :	
< 3.175 ; 4.191 > :	
< 4.318 ; 5.207 > :	
< 5.461 ; 15.494 > :	

Number of endings = 6:
Units: [mm]

To clipboard Save

Pixels Units mm

View details Marked image

Exit Image to clipboard

Note

Area = 2048.302
Volume = 1017.113
Surface = 7135.961
Length = 4532.528

Histogram

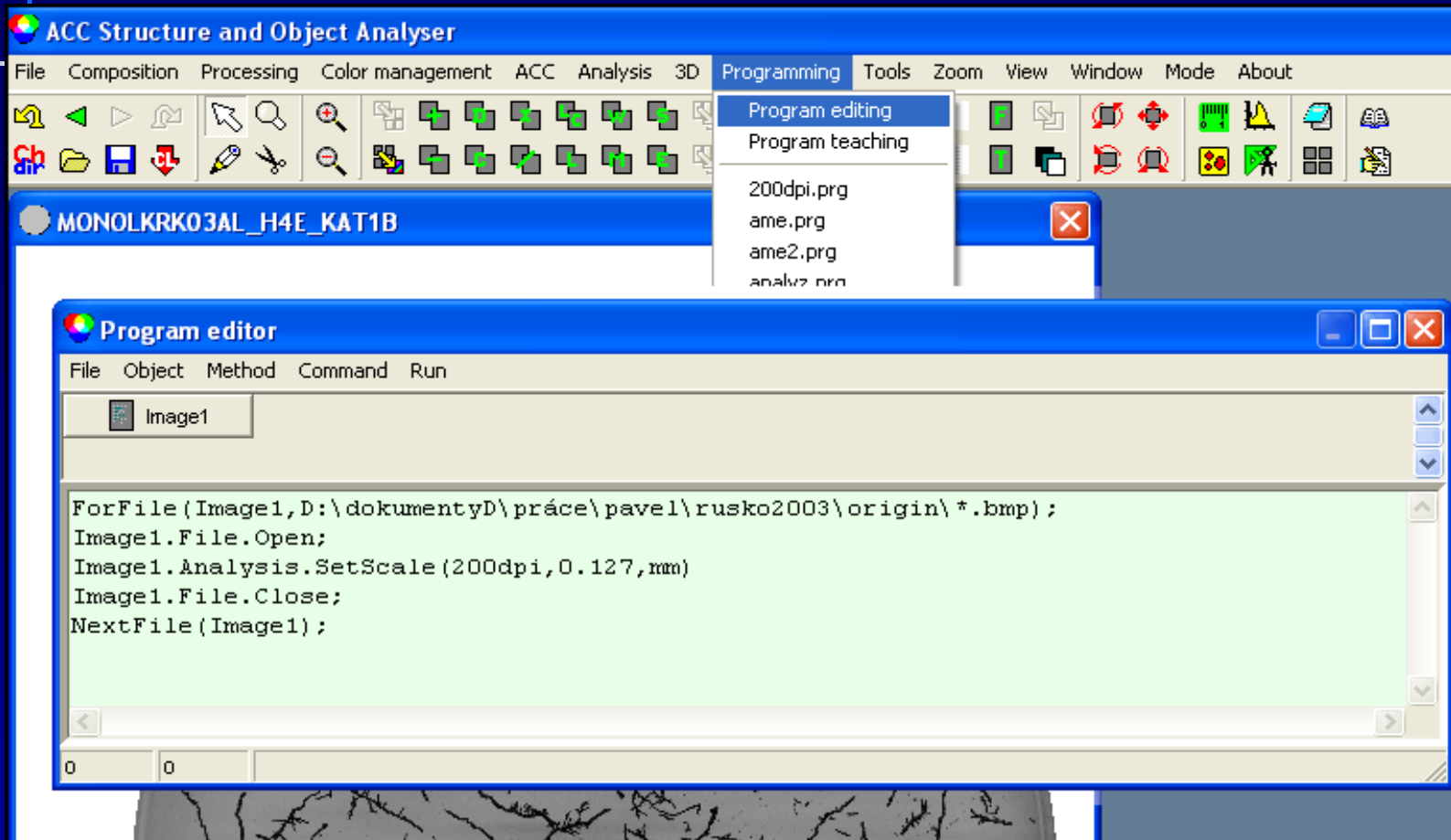
< 0.127 ; 1.016 > :	4502.112
< 1.143 ; 2.032 > :	30.416
< 2.159 ; 3.048 > :	0.000
< 3.175 ; 4.191 > :	0.000
< 4.318 ; 5.207 > :	0.000
< 5.461 ; 15.494 > :	0.000

Number of endings = 699
Units: [mm]

7. Vlastní měření

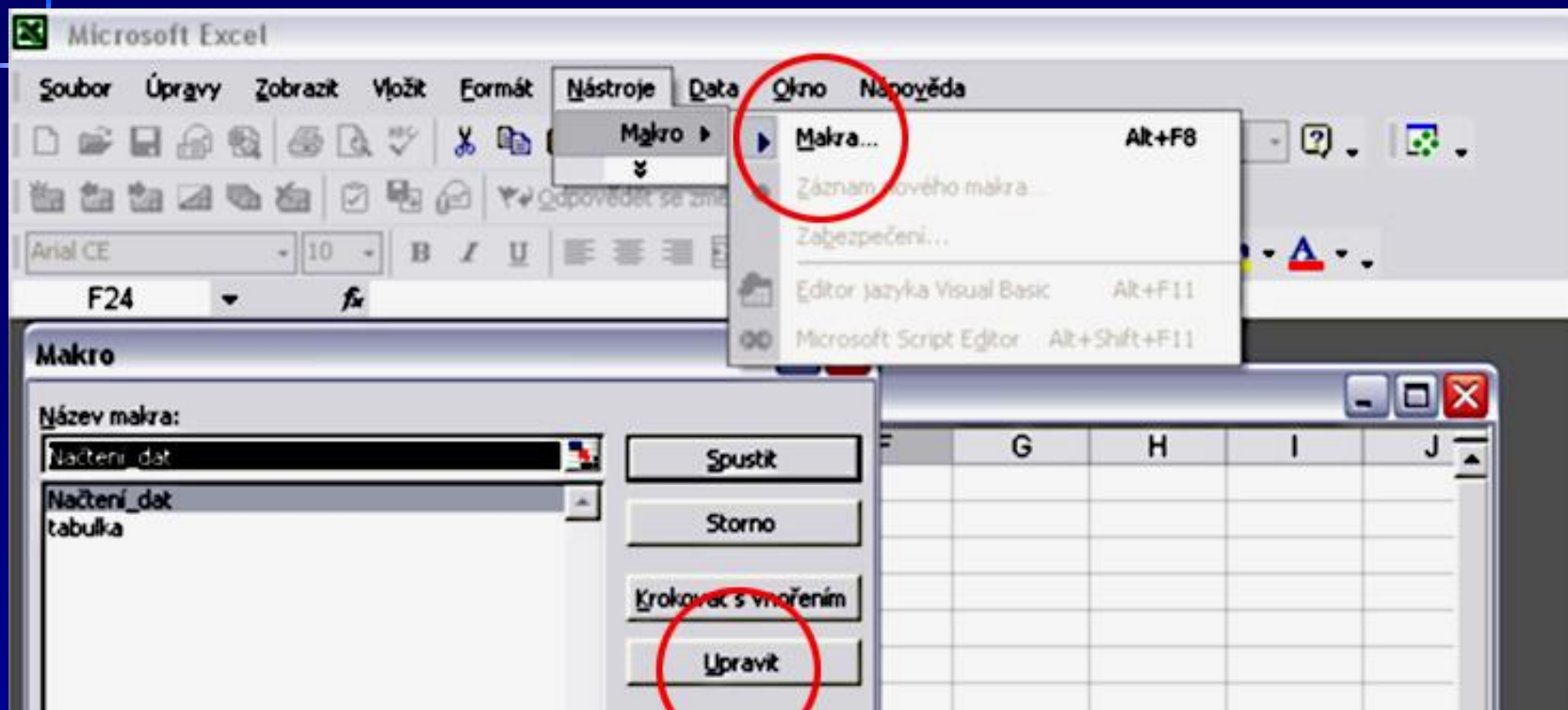
Panel nástrojů procedury Root analysis obrazového analyzátoru ACC, rozvinutá hlavní nabídka a tabulka výsledků, červeně jsou zvýrazněny povinné procedury, na pozadí je snímek pracovní vrstvy kořenového systému na Petriho misce po ukončení měření; je označena jednopixelová osa každé části kořenového systému (modře) a jednotlivé počítané kořenové špičky (kroužky).

8. Ukládání výsledků
9. Dávkové procedury
10. Převod výsledků měření z formátu *.txt do formátu *.xls



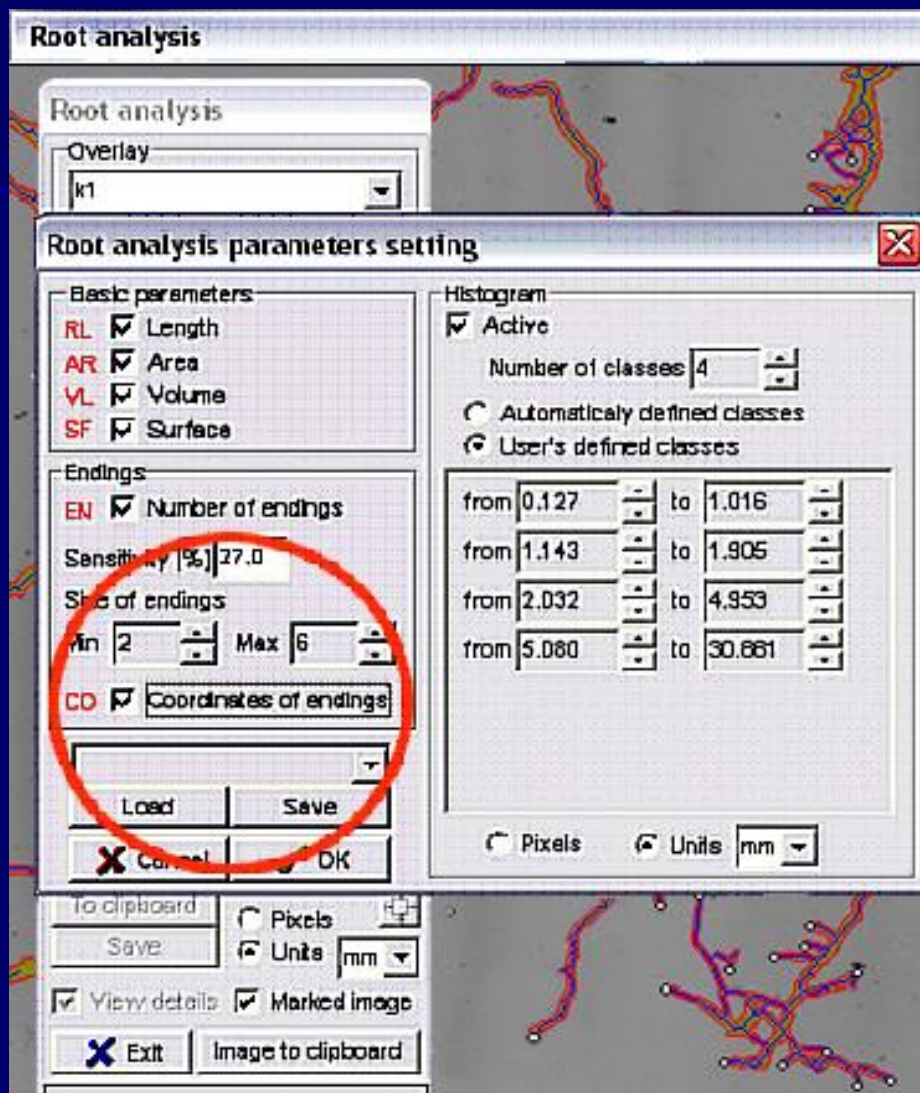
Interní programovací jazyk analyzátoru ACC, panel ovládání jazyka se zapsaným makrem pro dávkové vkládání jednotek, na pozadí je snímek kořenového systému na Petriho misce před začátkem měření.

Automatizovaný převod dat z výstupního textového souboru ACC do tabulkového procesoru MS Excel



Panel nástrojů v tabulkovém editoru MS Excel, procedury nutné pro uložení a spouštění makra jsou zvýrazněny červeně.

Automatická vyčíslení hlavních parametrů jemných kořenů: délky, plochy, objemu, povrchu a počtu kořenových špiček

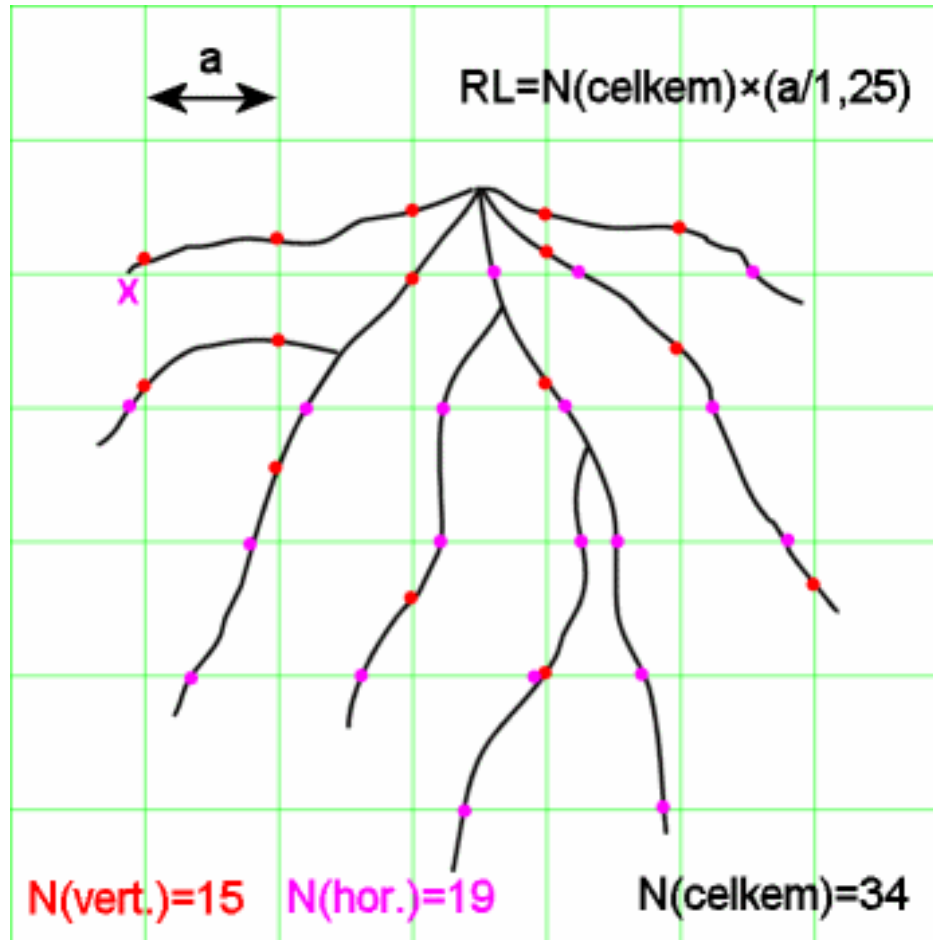


Ovládací panel původního nastavení parametrů kořenové analýzy programu ACC s novou funkcí - souřadnice zakončení, pod panelem jsou patrné označené objekty před měřením.

Průsečíková metoda

- Pod Petriho misku dáme čtvercovou síť; v misce rozložíme náhodně a rovnoměrně kořeny. Počítáme průsečíky kořenů se sítí.
- $RL = N \times (a/1,25)$
kde
N...celkový počet průsečíků
a...délka hrany elementárního čtverce v mřížce
- http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/kultivacni_experiment_vyhodnoceni.htm

Znázornění průsečíkové metody



Specifická délka

- $SD = \text{celková délka (cm)} / \text{hmotnost sušiny (g)}$
- čím vyšší specifická délka tím více rozvětvení, více slabých kořenů apod.
- z toho vyplývá, že čím je vyšší hodnota, tím je lepší kolonizace půdy (Ostonen et al. 2009)

Kolonizace houbovým symbiontem

- **Průsečková metoda** - počítáme zvlášt průsečíky s ektomykorhizami a nemykorhizními kořeny.
- **Procenta ECM kořenových špiček** – špičkou se myslí poslední řád větvení kořene omezeného růstu; špičkou nemyslíme vrchol kořene!
- **Analytické metody** - poměrně přesná je metoda stanovení ergosterolu, která je zaměřena pouze na žijící houbové struktury (Nylund, Wallander 1992). Ještě přesnější jsou metody využívající specifické fosfolipidové mastné kyseliny, které jsou schopné eliminovat nemykorhizní houbové struktury (Gryndler et al. 2004).
- **Stabilní izotopy ^{13}C a ^{15}N** - v poslední době se stále více uplatňují i pro tyto účely metody pomocí stabilních izotopů ^{13}C a ^{15}N (Wallander et al. 2004).

Ektomykorhiza



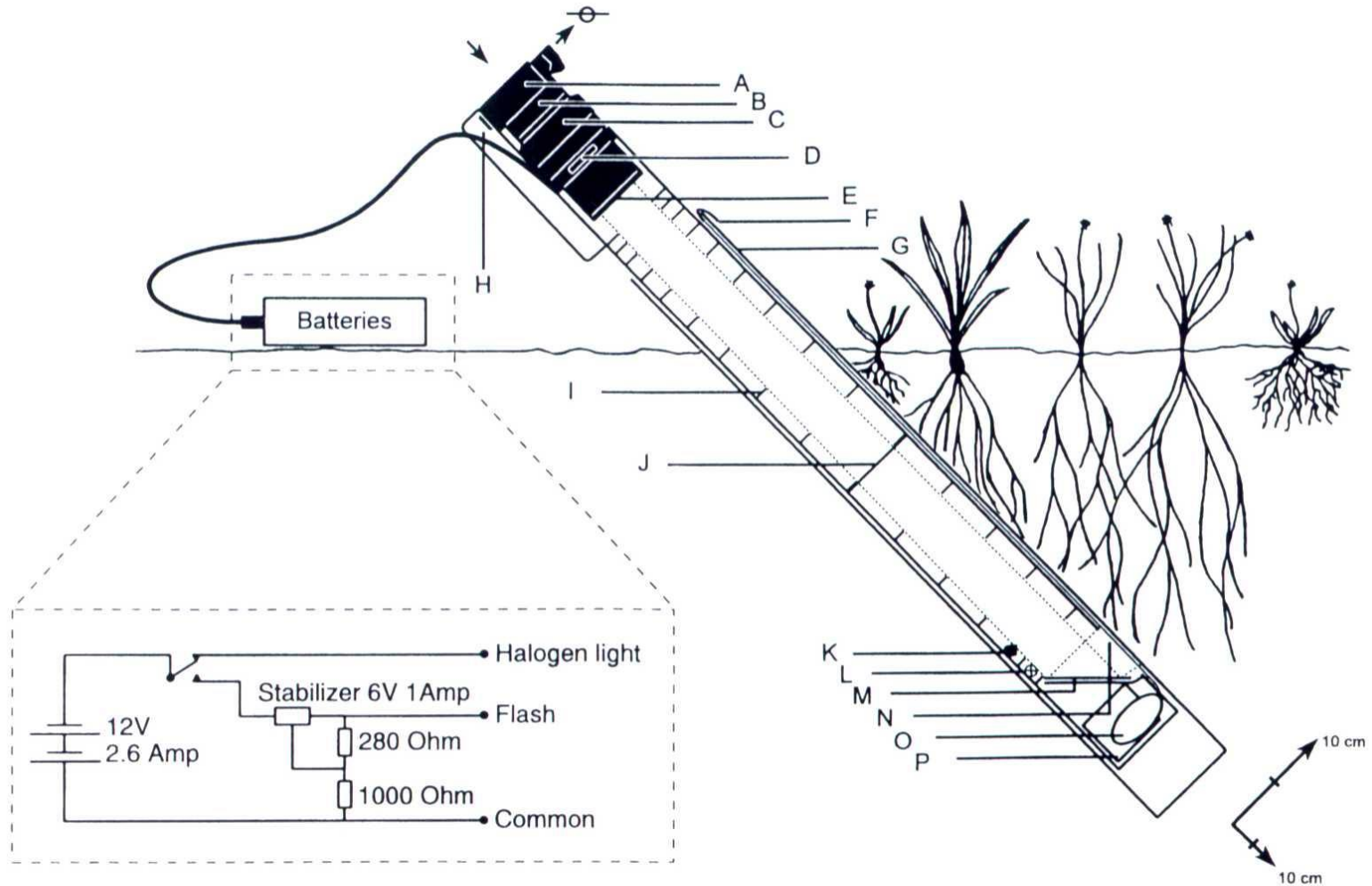
Nemykorhizní kořenová špička



Sledování vývoje EKM

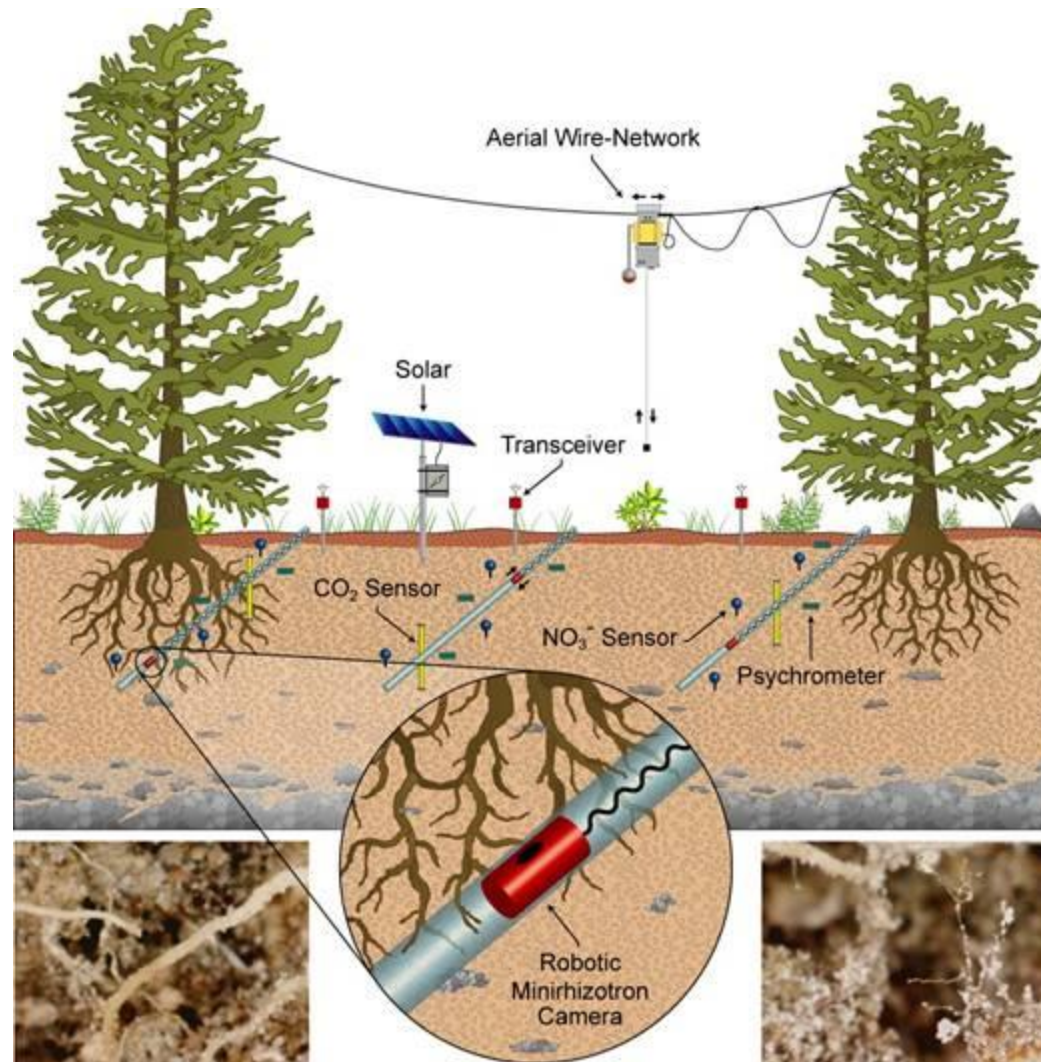
- **Kořenová okna** - Kořenová okna jsou šikmo na půdu položené skleněné nebo plexisklové desky. Desky musí být v těsném styku s půdou a musí být zakryty před světlem. Sledujeme převážně růst kořenů, který zaznamenáváme pomocí fotoaparátu či zakreslováním přímo na desku, ale i vývoj, životnost a rozložení ektomykorhiz (Smith et al., 2000).
- **Rhizoskop** - rhizoskop je plexisklová trubka šikmo zavrtnaná do půdy. Její povrch je z vnitřku snímán videokamerou či fotoaparátem. Sledujeme růst, vývoj a rozložení ektomykorhiz .
- **Sáčky pro vrůstání kořenů** (ingrowth backs, ingrowth cores) - prorůstavé pytlíky ze síťoviny (\varnothing ok 1mm) kterou prorůstají kořeny. Síťka je vyplněna materiálem, který je vykopán v místě vložení síťky do půdy. Musíme dodržet rozložení a tloušťku horizontů. Sledujeme schopnost růstu a regenerace kořenů (Godbold et al. 2003).
- **Prorůstavé síťky** - zapichují se kolma do půdy; Po roce se síťky z půdy vyříznou. Vyřízne se sonda hluboká na délku síťky a široká 5 cm na každou stranu od síťky a dlouhá na šířku síťky. Slouží ke zjišťování prorůstání (regenerační schopnosti) jemných kořenů.
- **Odběr od stromu** - odběr od stromu se provádí v případě, že chceme znát stav ECM systému sledovaného stromu. Kořen sledujeme od kořenového náběhu až k jemným kořenům; postupujeme jemným vyhrabáváním kořene až se dostaneme k jemným kořenům a k jejich špičkám.

Ukázka rhizoskopu



- <http://www.geert.com/minirhizotron/RhizoSchema2.jpg>

Ukázka použití rhizoskopu



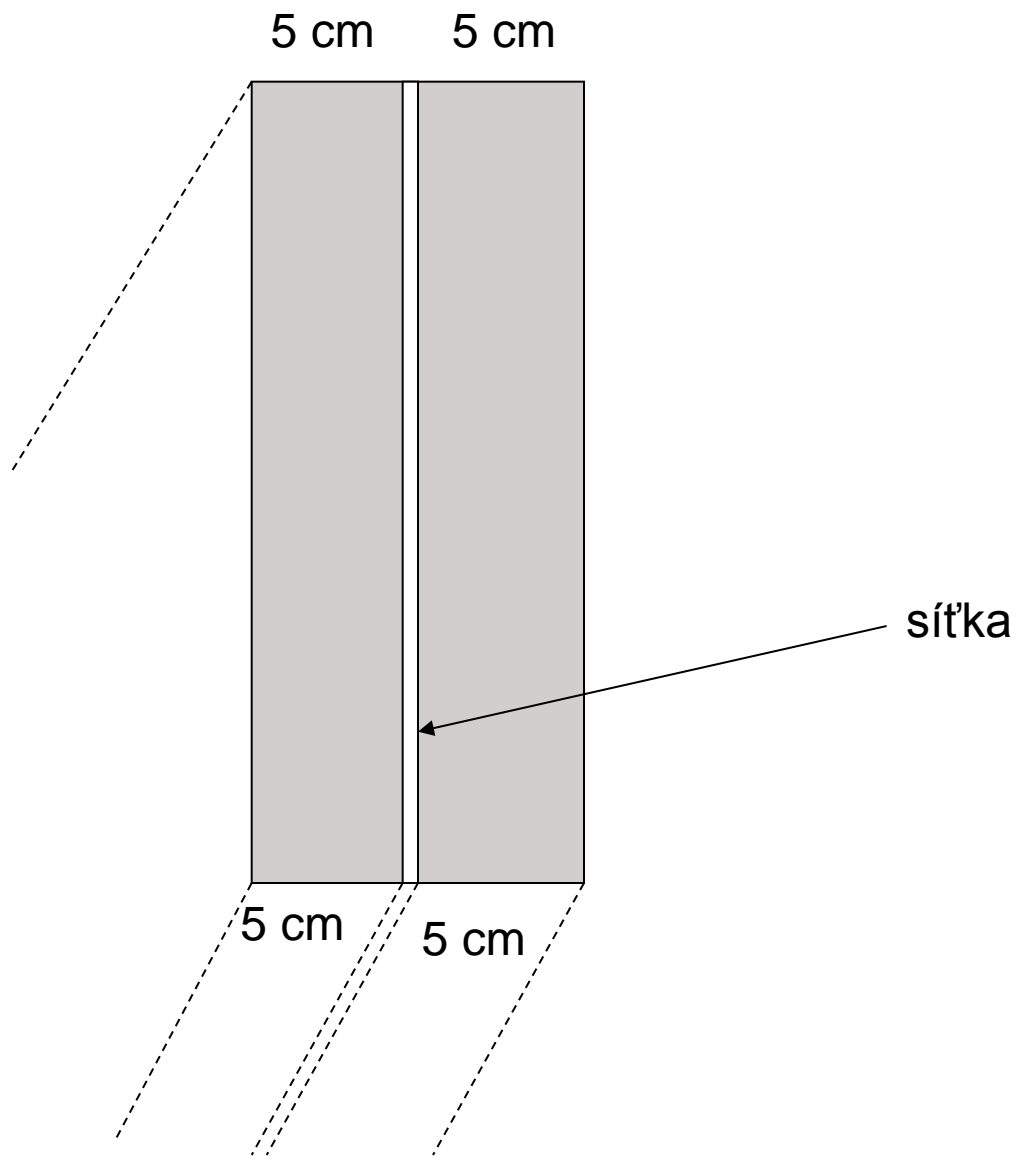
- http://ccb.cmsdev.ucr.edu/amarss_posts/color-diagram.jpg

Zpracování snímku z rhizoskopu



- http://www.ars.usda.gov/sp2userfiles/ad_hoc/54090000PHACE/images/minirhizotron2.JPG

Vyřezávání prorůstavé sítky



Zjišťování fází vývoje a tříd vitality ektomykorhiz



Fáze 1

Fáze 2

Fáze 3

Fáze 4

Fáze 5

Kořenové špičky

(Cudlín, Chmelíková 1999)

fáze 1 - špička s aktivním meristémem

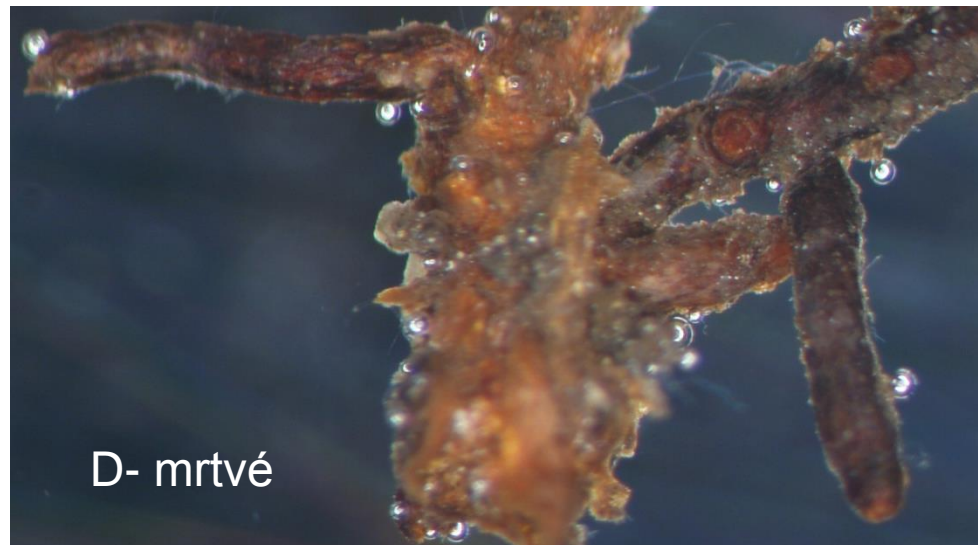
fáze 2 - špička s kořenovým vlášením

fáze 3 - nemykorhizní špička,

fáze 4 - počáteční stádium rozvoje mykorhizy

fáze 5 - plně vyvinutá mykorhiza

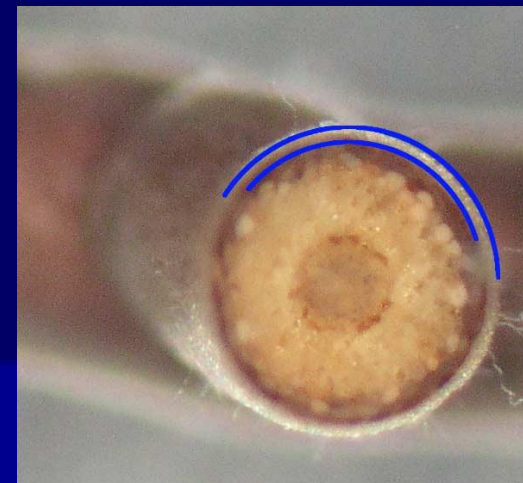
Třídy vitality



Určování jednotlivých fází vývoje mykorrhiz pod binokulární lupou

Vybrané snímky často se opakujících fází vývoje a tříd vitality ve vzorcích kořenových systémů smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.).

Kořenová špička 5/T, modře zvýrazněný je mykorrhizní plášť, příčný řez kořenovou špičkou.



Kořenová špička 5/T, ulomená špička 5/D.



Kořenová špička 1/S.

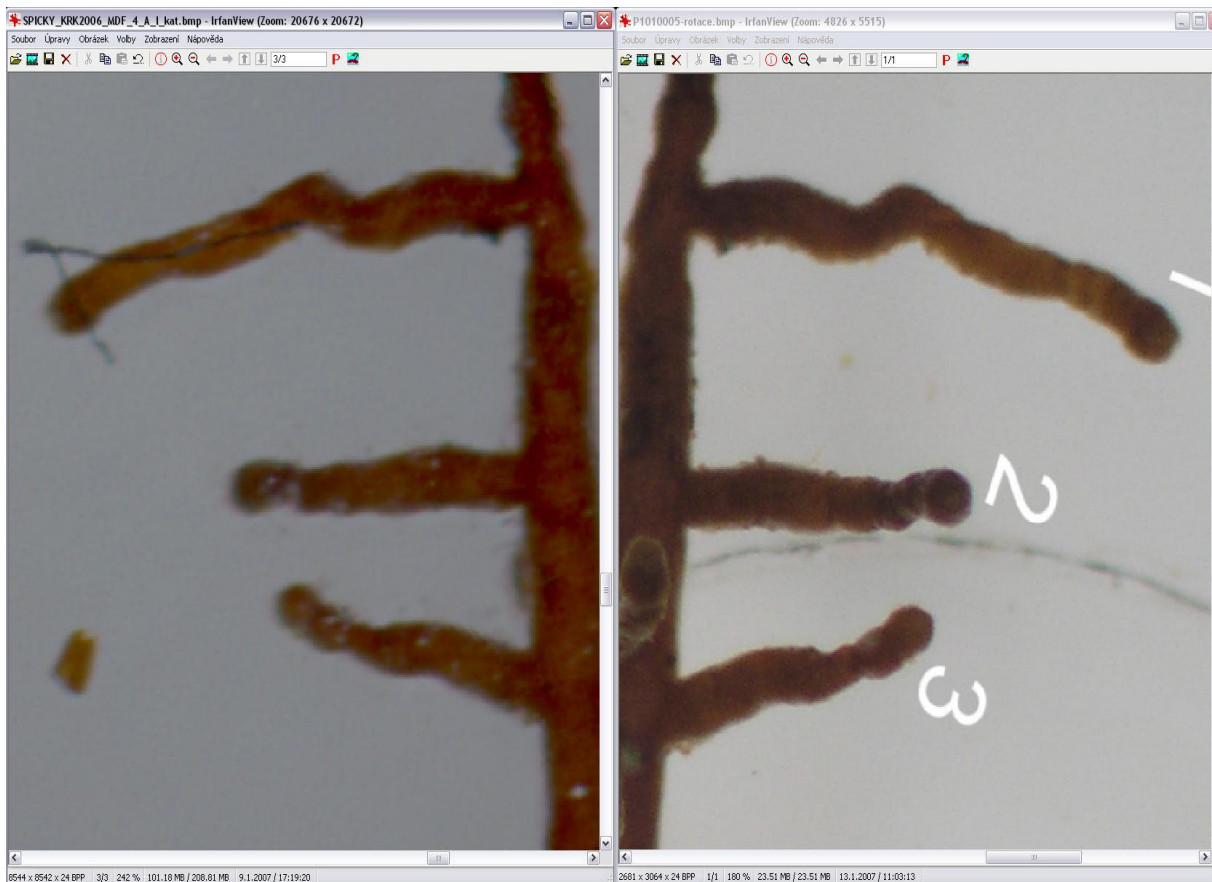


Kořenová špička 4/S (bez vytvořeného mykorrhizního pláště, třída vitality S.

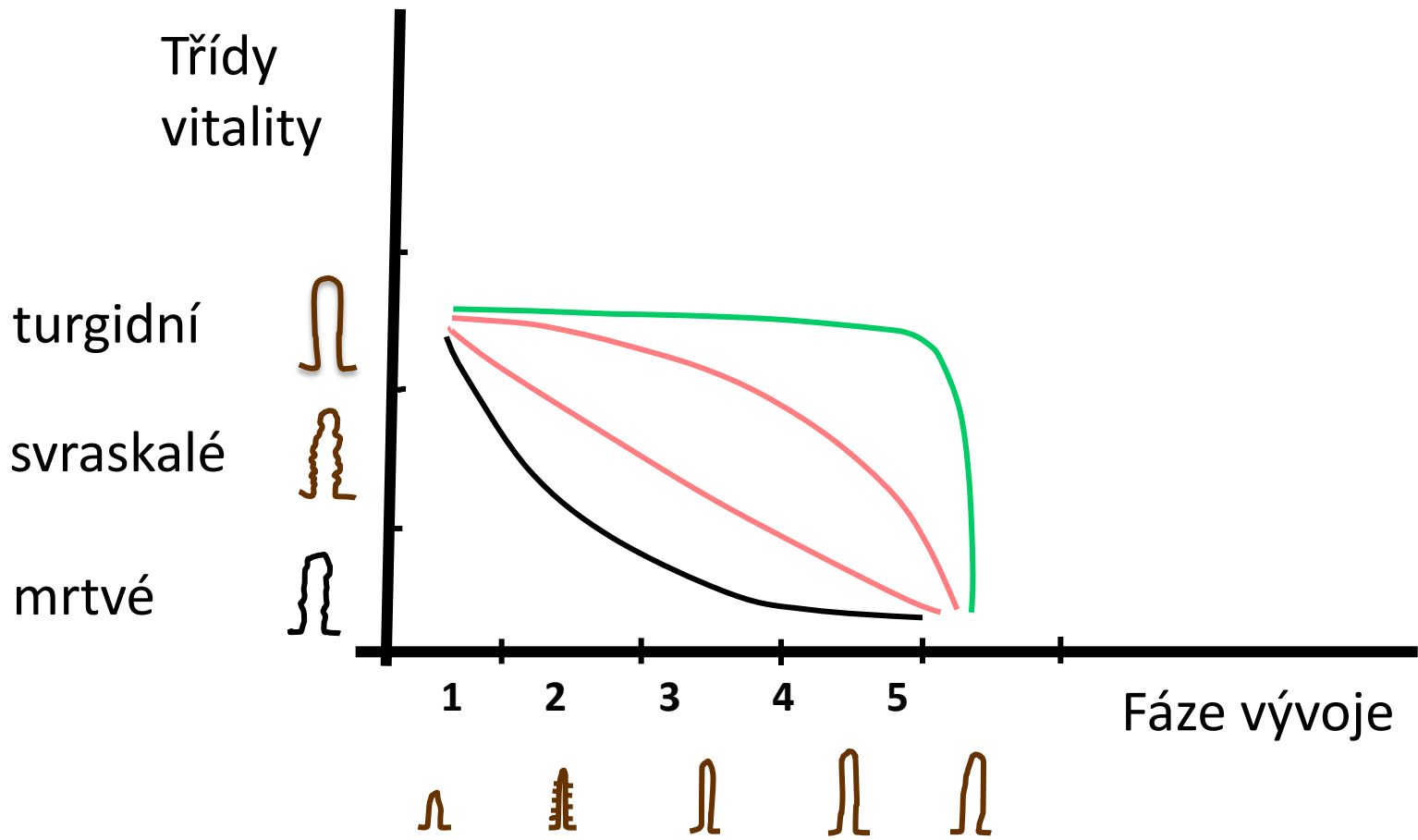


Kořenová špička 5/D, v modrém kruhu je patrné odstranění povrchu pláště tak, aby pod binolupou byla vidět primární kůra.





Porovnání hloubky ostroty snímku ze scanneru (vlevo) a binolupy (vpravo) při přibližně stejném zvětšení



Zjišťování biodiverzity ektomykorhizních (ECM) symbiontů

- ***Sběr plodnic*** - plodnice sbíráme v době fruktifikace 3 – 6 krát za sezónu, většinou v třítydenních intervalech. Zjišťujeme počet druhů a počet plodnic jednotlivých druhů. Jde o nělikaletý výzkum. Poměr saprofytických a mykorhizních druhů hub může naznačit něco o stavu lesního ekosystému (normální je poměr $1 \geq 1$).
- ***Kultivace mycelia*** – provádí se ze sterilně získané části plodnice na speciálních agarových médiích
- ***Popis morfortypů*** - ektomykorhizy lze rozlišit do jednotlivých morfortypů na základě morfologických znaků, příp. můžeme použít i mikroskopické znaky na řezech (Agerer, Rembold 2004-2008). Na základě zjištěných morfortypů a jejich opakování můžeme pomocí indexů biodiverzity usuzovat na stav společenstva EKM.
- ***Metody molekulární biologie***

Zjišťování diverzity ektomykorhizních (ECM) morfotypů

- Menhnikův index biodiverzity

$$D_{Mn} = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

počet morfotypů

počet morfotypů s opakováním

- Vyšší index = vyšší biodiverzita

Využití molekulárních metod ve výzkumu mykorhiz

Martina Vašutová

Osnova

- význam molekulárních metod pro studium mykorhiz
- sekvenování, porovnávání ITS rDNA
- pyrosekvenování
- real time PCR

Doporučená literatura

Šmarda J. et al. (2005): Metody molekulární biologie. – Brno.

Čapková-Frydrychová R. et al.: Kurz základních metod molekulární biologie. – www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/ZMMB4.pdf

Cvrčková F.: Úvod do praktické bioinformatiky. – Academia.

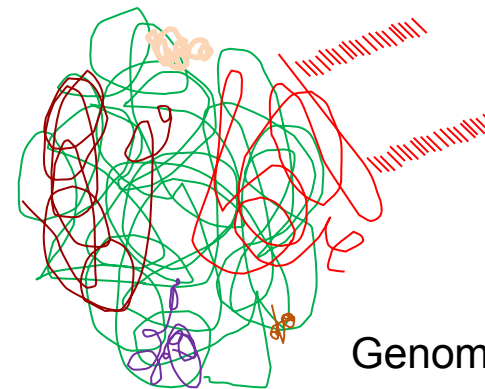
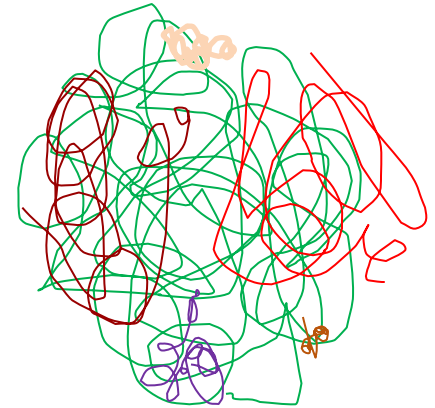
Sekvenování, porovnávání sekvencí

Standardní metoda

1. izolace DNA
2. namnožení ITS rDNA (PCR)
3. vizualizace gelovou elektroforézou
4. sekvenování (formou služby)
5. porovnávání sekvencí

Nevýhody: cena, chybná data v databázích, pracnost

Genomová
DNA ze
špiček

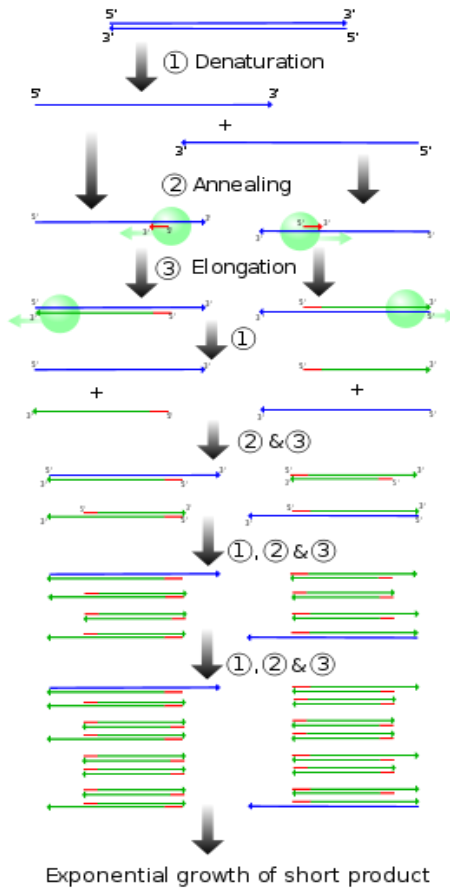


Genomová DNA ze špiček
– amplifikovaný ITS úsek
DNA houbového
symbionta

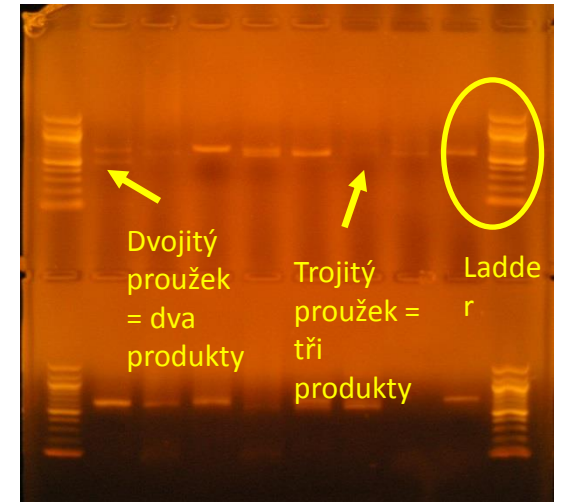
Izolace DNA



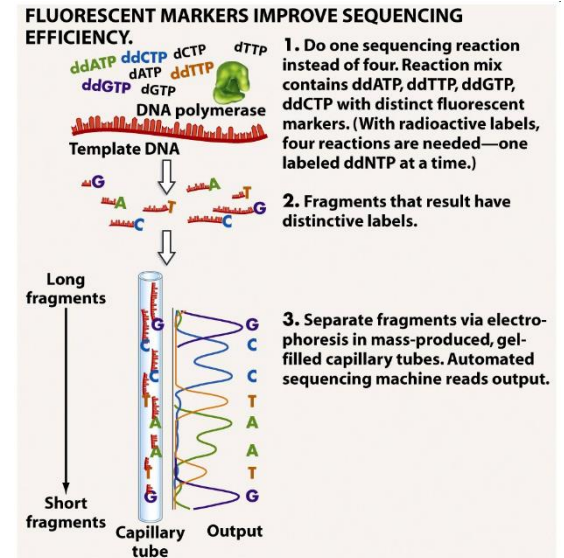
PCR



Gelová elektroforéza



Sekvenování



Úprava sekvence, identifikace druhu

>BK231_ITS4

```
AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTACAMGCG
AGGGTTGTCGTGGCCTCTCGGGGCATGTGCACGCCCGA
GCCATCCCCCAACAAACACCGTGGGCCTTCGGGCCCGC
GTATATTTACTCTGAATGTGTATAGAATGTAAACCATTTGTT
TGCCCTGAAAAAGCAAACGAAAAAAAATACAACCTTTCAAC
AACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCC
GAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCCTCAACCG
CGCCGATTGATTTGGTGGGGCTTGACTTTGGAGCGT
```



Current version: 5.0; Release date: 18.12.2012 ([read more](#))
Number of UNITE fungal Species Hypotheses: **52 481** (based on 98% threshold value, see also SH statistics below)
Number of fungal ITS sequences in current version (UNITE+INSD): **352 050**

UNITE provides unified way how you delimit, identify, communicate and work with DNA based Species Hypotheses (SH). All SHs are connected to the taxon name and classification. Read [Köljalg et al. 2013](#) paper for the description of the system.

What is Species Hypothesis?

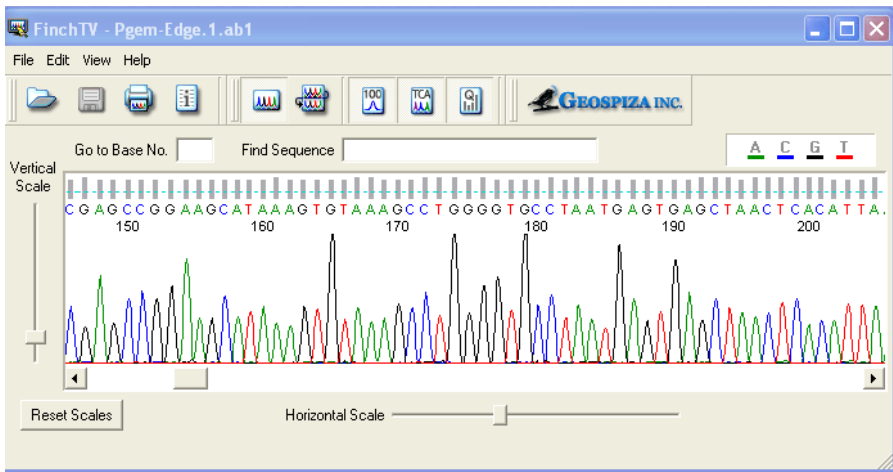
Species Hypothesis – any species level group of individuals that share a given set of observed

What are reference and representative sequences?

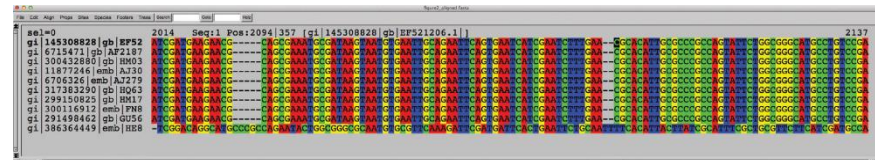
Reference sequence (RefS) – serves as a name anchor for the Species Hypothesis and is chosen by

UNITE Community

Members
Join
UNITE list



Mnohonásobné přiřazení



454 - pyrosekvenování

Nová metoda ke studiu mykorhiz

Založena na detekci pyrofosfátu, který je vedlejším produktem polymerizace DNA. Vzniká poté co DNA polymeráza inkorporuje dNTP do prodlužujícího se řetězce. Několika enzymatickými kroky je pyrofosfát konvertován na ATP které pohání luciferázovou reakci. Proto je pozorována světelná emise, když je do rostoucího řetězce DNA přidán další nukleotid.

Izolace DNA, 2 PCR, emulzní PCR, pyrosekvenování

Umožňuje analýzu celého společenstva, ca 60-150 tis readů (ca 35 tis Kč)

Real time PCR

Zjištění biomasy konkrétního druhu

Detekce průběhu reakce (fluorescenční značení) – speciální cycler

Konstrukce amplifikačních křivek (1) „background“ fázi 2) **exponenciální fáze** 3) fáze plató

Hodnota „treshold cycle“ C_T – číslo cyklu, v němž křivka dosáhne exponenciální fáze

Lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky

