

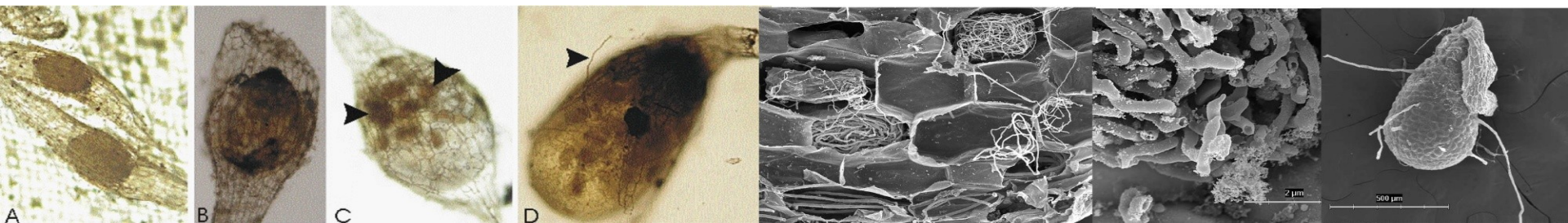
Metody studia kořenových systémů

Orchideoidní mykorrhiza

není žádný idylický vztah..

2. 4. 2016

Tamara Těšitelová



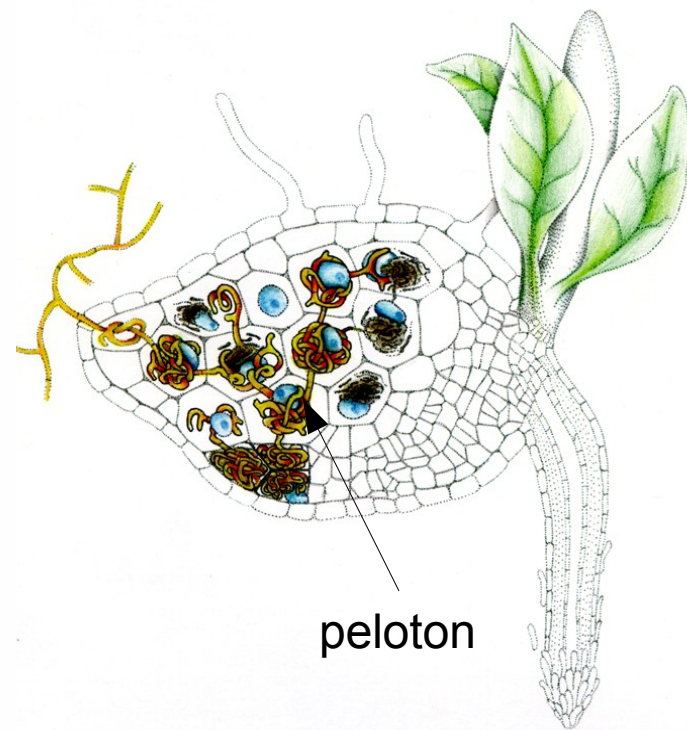
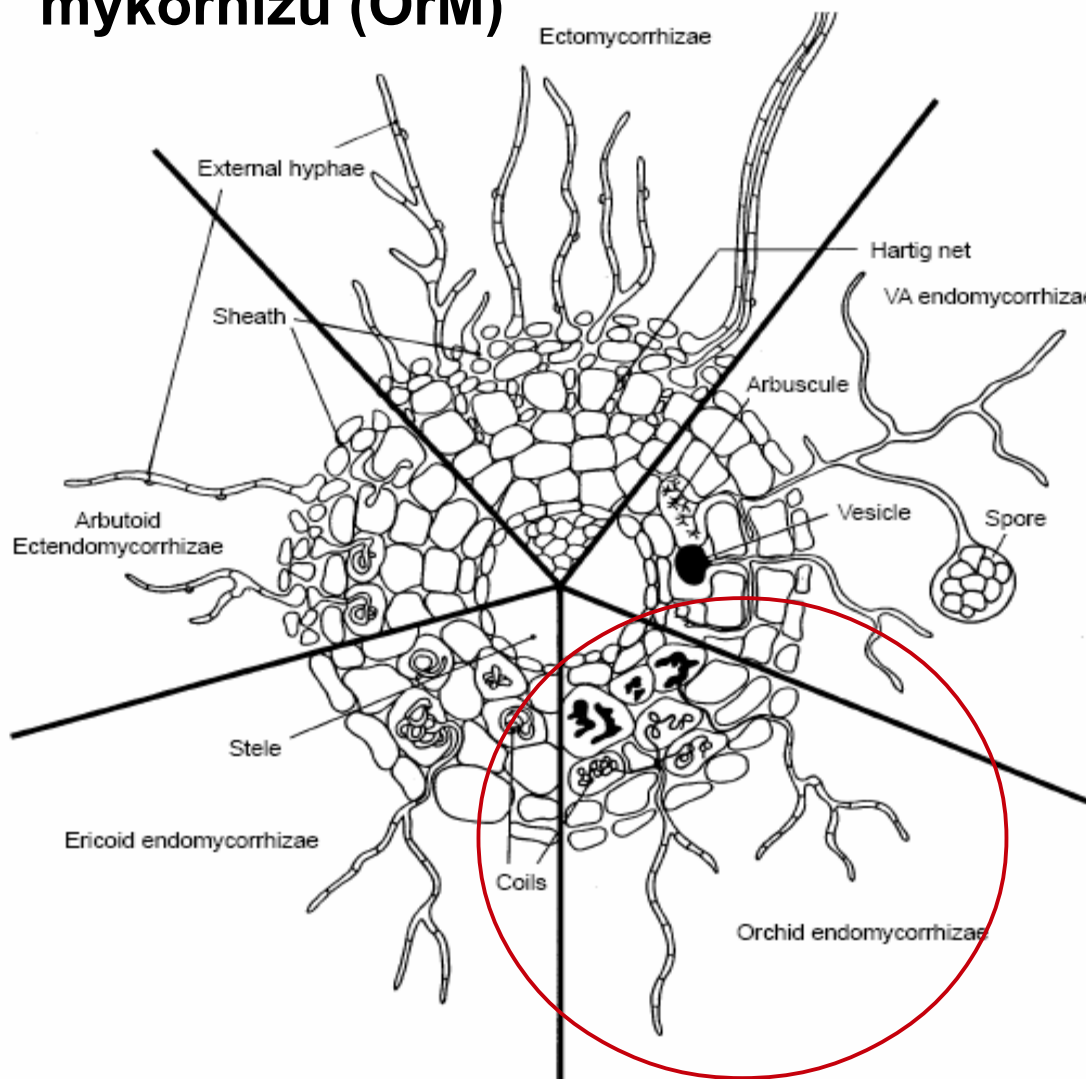
Orchidaceae

- mladá čeled' ~ 100mil let
- druhově extrémně bohatá: přes 20000 druhů
- velká bohatost růstových forem (terrestriti, epifyti, epiliti..)
- kosmopolitní rozšíření, osídlení v podstatě všech biotopů



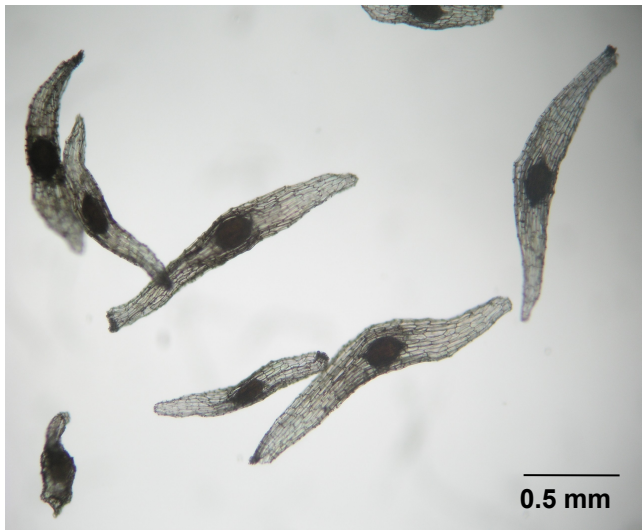
Orchidaceae

- všechny druhy vytváří unikátní typ mykorrhizy – **orchideoidní mykorrhizu (OrM)**



Orchidaceae

- **všechny druhy obligátně mykorhizní**
 - malá semena s minimem zásobních látek (~150-200 μm)
 - naprostá závislost na výživě houbou během klíčení
 - *parazitismus* (úplná mykoheterotrofie) v rané fázi vývoje



'staré' vs. 'mladé' symbiózy...

AM houby ~ 200 druhů vs. AM rostliny ~ 200 000 druhů

ECM houby ~ 6000 druhů vs. ECM rostliny ~ 20 000 druhů



„staré“ typy mykorhiz, většinou mutualistické symbiózy (*sensu lato*)

vs.

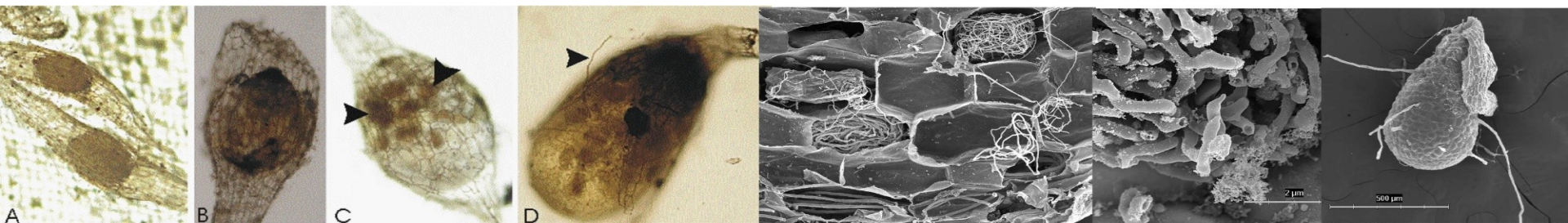
málo specifická, často fakultativní pro rostliny, ale obligátní pro houby

„mladé“ typy (100mil), **parazitické symbiózy** (+ monotropoidní, pyroloidní)

často velmi specifická, pro rostlinu /parazita/
obligátní, pro houbu /hostitele/ lehce postradatelná

evoluční „souboj“ mezi parazitem a hostitelem
a velká ekologická rozrůzněnost hub

→ rozšíření niky skrze různorodé hostitele, specializace,
diverzifikace !

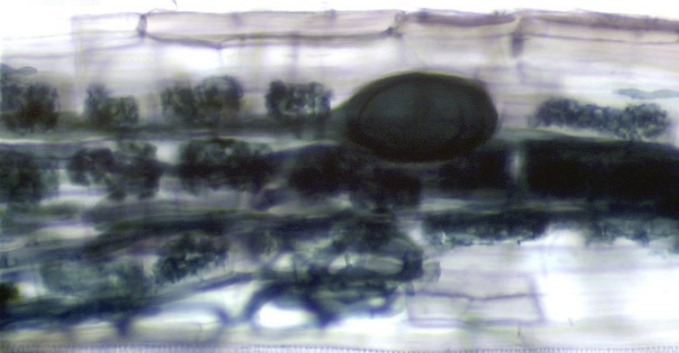


Vzhled mykorhizy (duálního orgánu)

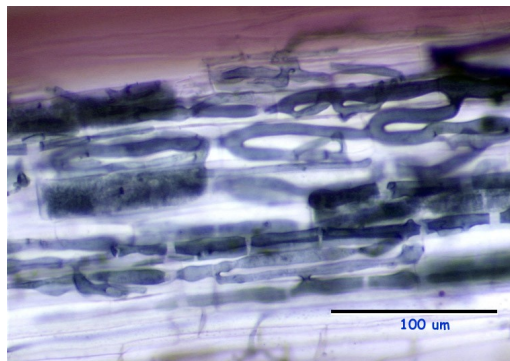
U „slušných“ mykorhiz záleží vzhled na druhu houby (částečně asi i rostliny)

AM mykorhizy (foto zapůjčeno od Petra..)

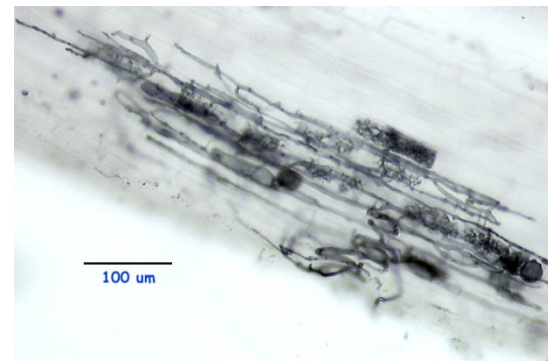
100 μ m



Glomus



Scutellospora



Acaulospora

ECM mykorhizy (foto z <http://www.deemy.de/Taxa/Images.cfm>)



Tuber (Ascomycota)



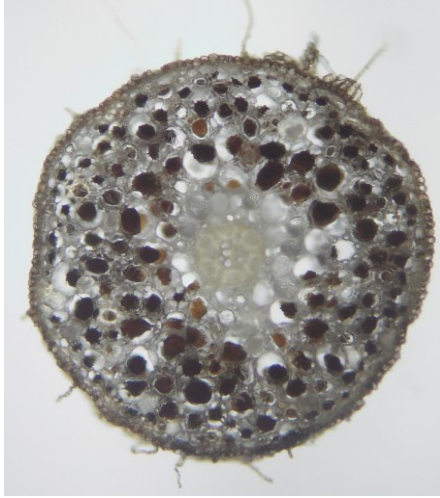
Tomentella (Basidiomycota)



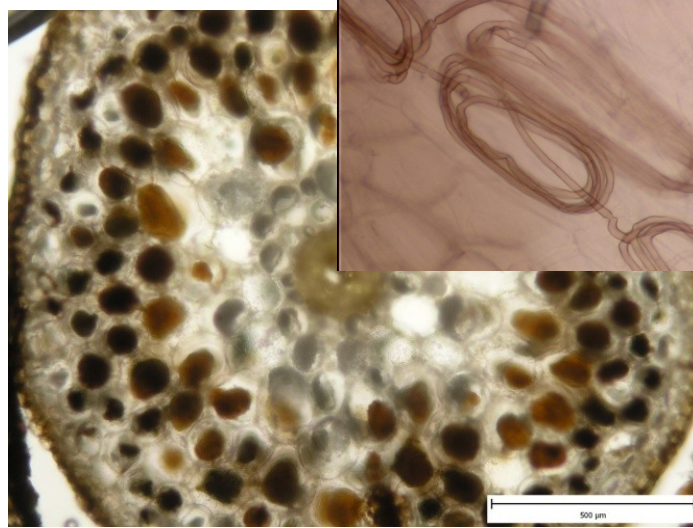
Russula (Basidiomycota)

U parazitů výsledný vzhled mykorhizy nejspíš dosti v režii rostliny...

u OrM vypadá jakýkoliv druh houby na první pohled víceméně jednotně jako „hnědá koule“



Epipactis helleborine +
Tuber (Ascomycota)

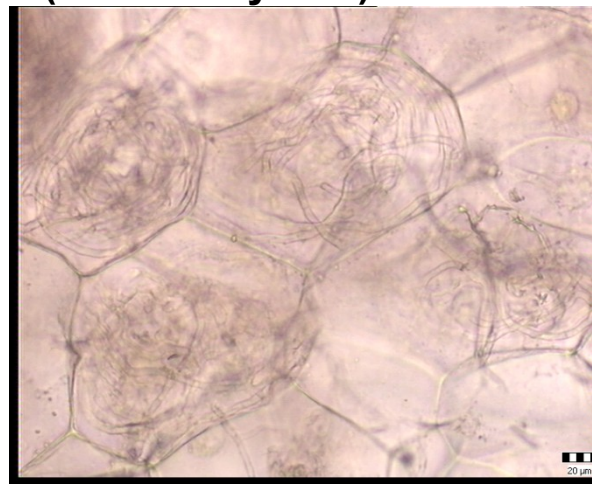
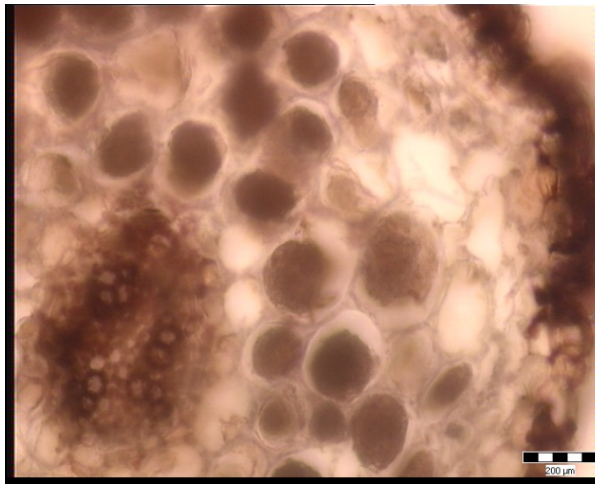


Epipactis atrorubens +
Wilcoxina (Ascomycota)



Listera cordata +
Sebacina (Basidiomycota)

Leucorchis + **Tulasnella (Basidiomycota)**



Russula (Basidiomycota)

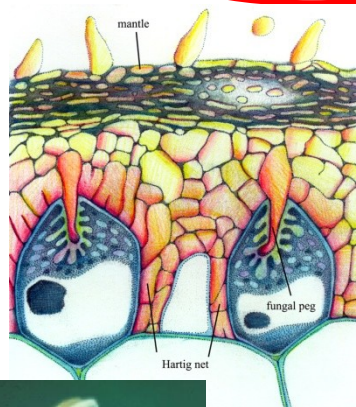


mutualismus

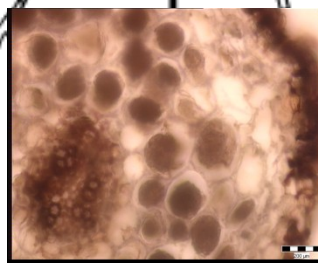


Ectomycorrhizae

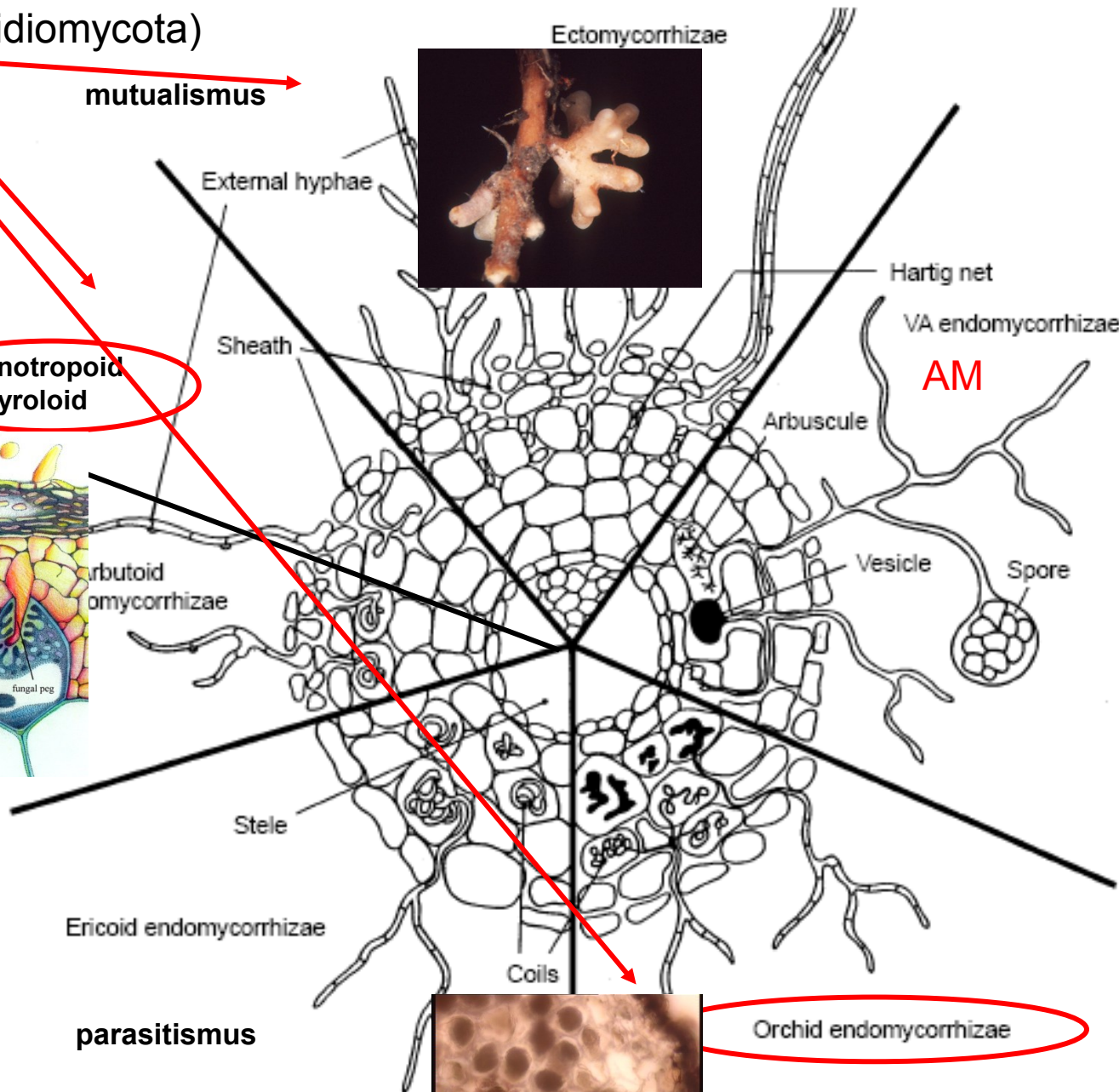
Monotropoid
+ pyroloid



parasitismus



Orchid endomycorrhizae



Orchideje úspěšně parazitují na širokém spektru ekologicky i taxonomicky rozrůzněných hub .. uhlík jde získat z čehokoliv..

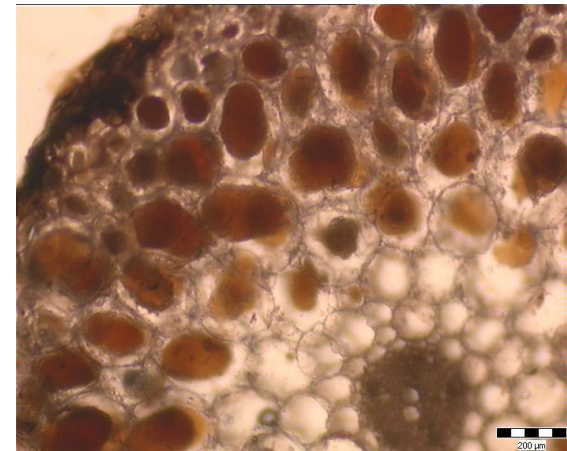
ECM Basidiomycota
Russula



ECM Ascomycota
Tuber



→ **Trojstranná symbióza/**
epiparazitismus
(parazitismus na ECM
mutualismu)



Orchideje úspěšně parazitují na širokém spektru ekologicky i taxonomicky rozrůzněných hub .. uhlík jde získat z čehokoliv..

ECM Basidiomycota
Russula



ECM Ascomycota
Tuber



dřevokazné Basidiomycota
Armillaria



Mycena



patogeni rostlin
Ceratobasidium (Basid.)



endofyty a saprofyti
Sebacina (Basid.)



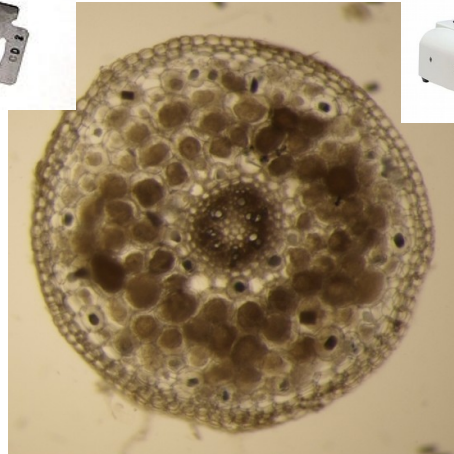
patogeni rostlin, rzi!
Atractiellomycetes (Basidiomycota)



Jak se k orchideoidním mykorhizám dostat..

..většina druhů je chráněných..

- kořeny dospělých rostlin mají kolem 5mm v průměru
- mykorhiza je dobře viditelná i bez barvení
- nutná pouze sterilizace povrchu pro kultivace *in vitro*
- výsev miniaturních semen pomocí diarámečků a planktonní sítky



Jak určit, který druh houby je ona „hnědá koule“?

..vždy je lepší kombinace více metod..

1. Molekulární analýzy – sekvenace úseku ITS nrDNA

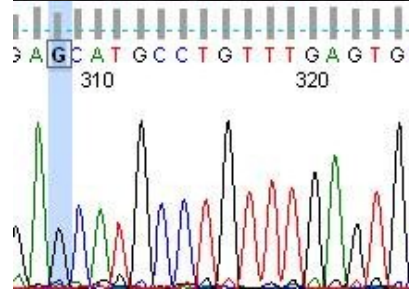
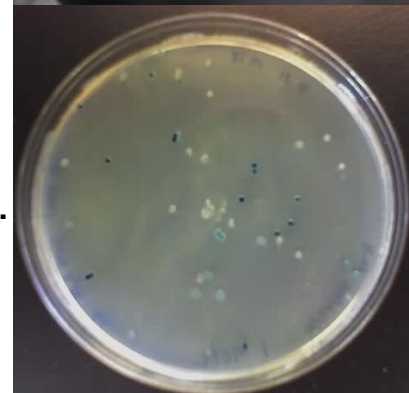
Výhody

- poměrně snadné zpracování mnoha vzorků
- velká diverzita získaných hub
- relativně přesná identifikace asociovaných hub pomocí databází (Genbank, UNITE, EMBL)

Nevýhody

- získám celé spektrum hub, nevím, která je/může být mykorhizní..
- finančně docela náročné
- problém s primery – nemáme žádné opravdu univerzální, nutné kombinovat různé

Možnost amplifikace přímo z pelotonů! (Kristiansen et al. 2011)



2. Izolace houbových kultur na živném médiu

výhody:

- možnost izolovat houby přímo z mykorhizních struktur
- je možné otestovat mykorhiznost houby pomocí symbiotických výsevů semen
- finančně celkem nenáročné

nevýhody:

- některé druhy nejde napěstovat
- vzácná fruktifikace kultur, takže špatné taxonomické rozlišení, často nespolehlivé → musí se sekvenovat
- pomalu rostoucí mykorhizní taxony často přerostlé endofyty
- detekují menší diverzitu hub než molekulární metody

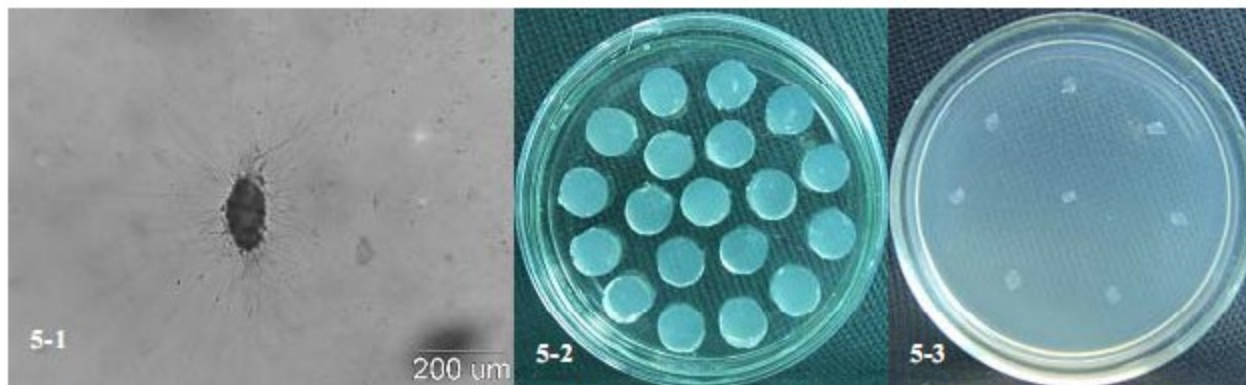
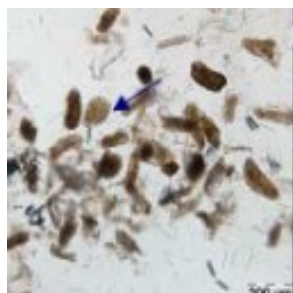
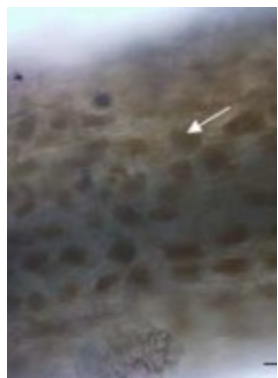
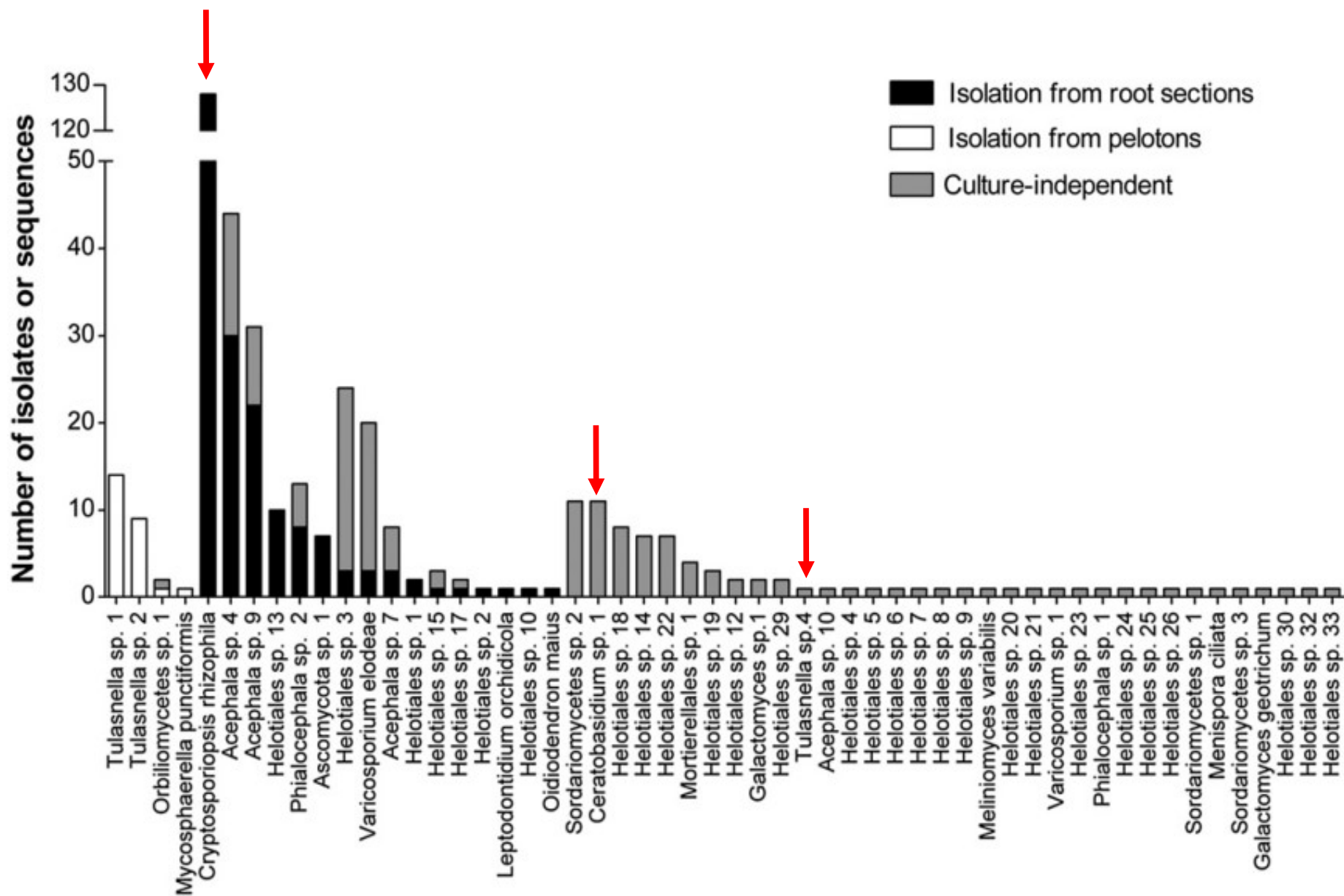


Fig. 5. Selective culture and purification of strains. **5-1.** Peloton in sterile distilled water with emerging hyphae. **5-2.** Selective culture of individual pelotons on agar disks. **5-3.** Purification of pelotons from which hyphae have emerged.

Izoláty a klony ze 6 dospělců *Pseudorchis albida* ze 3 lokalit

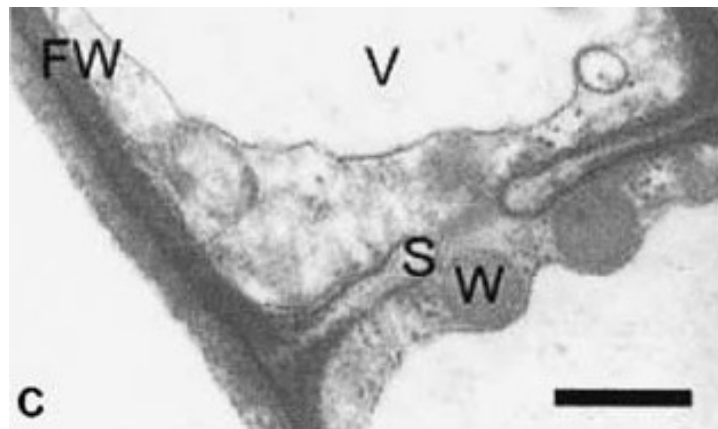


3. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) – analýza ultrastuktury mykorhizních hub

umožní hrubou identifikaci pravděpodobně mykorhizních hub:
ty tvoří pelotony a jsou obklopeny plazmatickou membránou rostliny (=nejsou to paraziti na rostlině)

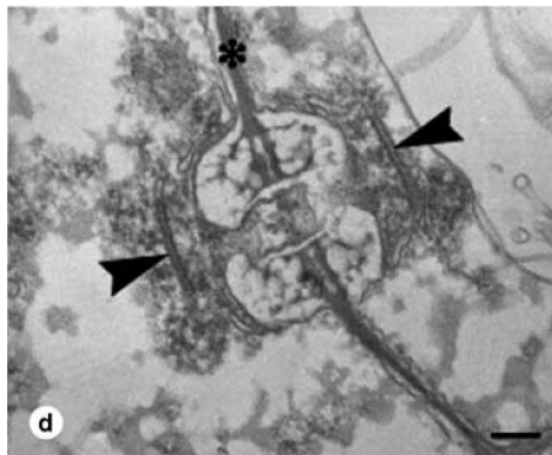
ale docela náročné na optimalizaci fixace..

Tuber (Ascomycota)

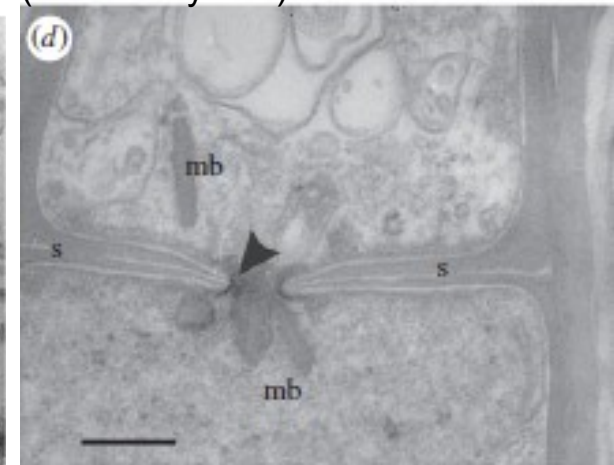


Selosse et al. 2004

Tulasnella (Basidiomycota)



Atractiellomycetes
(Basidiomycota)



Kottke et al. 2009

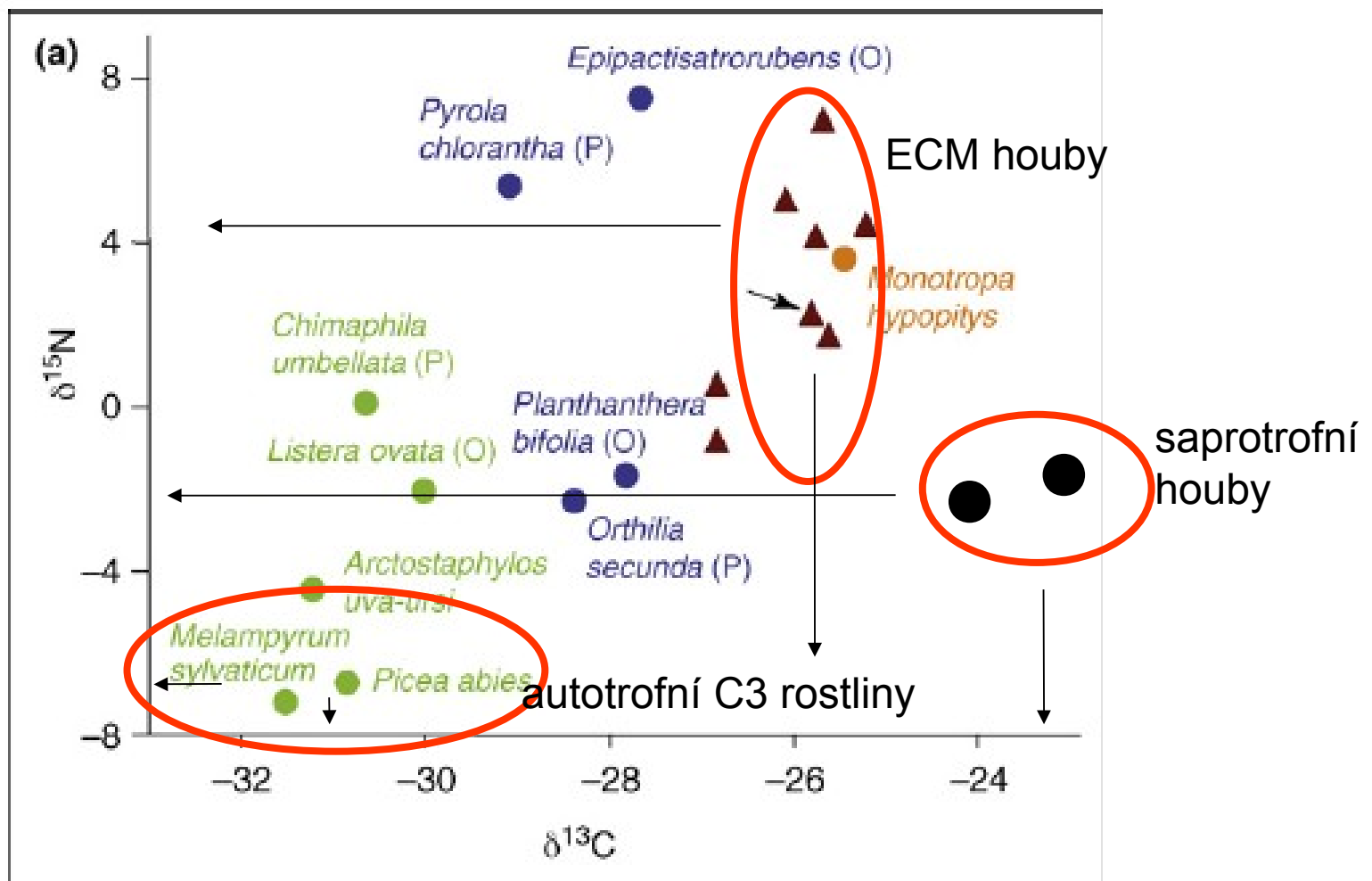
4. Přirozený obsah stabilních izotopů (příp. laboratorní ověření) může napovědět, co je zdrojem živin...

Element	Isotope	Percent abundance	Form & relative molecular mass difference
B			
Hydrogen	^1H	99.984	$^1\text{HD}/^1\text{H}^1\text{H}$
	^2H (D)	0.0156	(3/2), 50%
Carbon	^{12}C	98.982	$^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
	^{13}C	1.108	(45/44), 2.3%
Nitrogen	^{14}N	99.63	$^{15}\text{N}^{14}\text{N}/^{14}\text{N}^{14}\text{N}$
	^{15}N	0.3663	(29/28), 3.6%
Oxygen	^{16}O	99.759	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
	^{17}O	0.037	(46/44), 4.5%
	^{18}O	0.204	

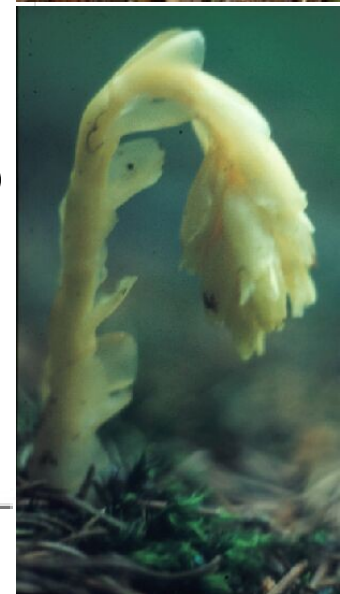
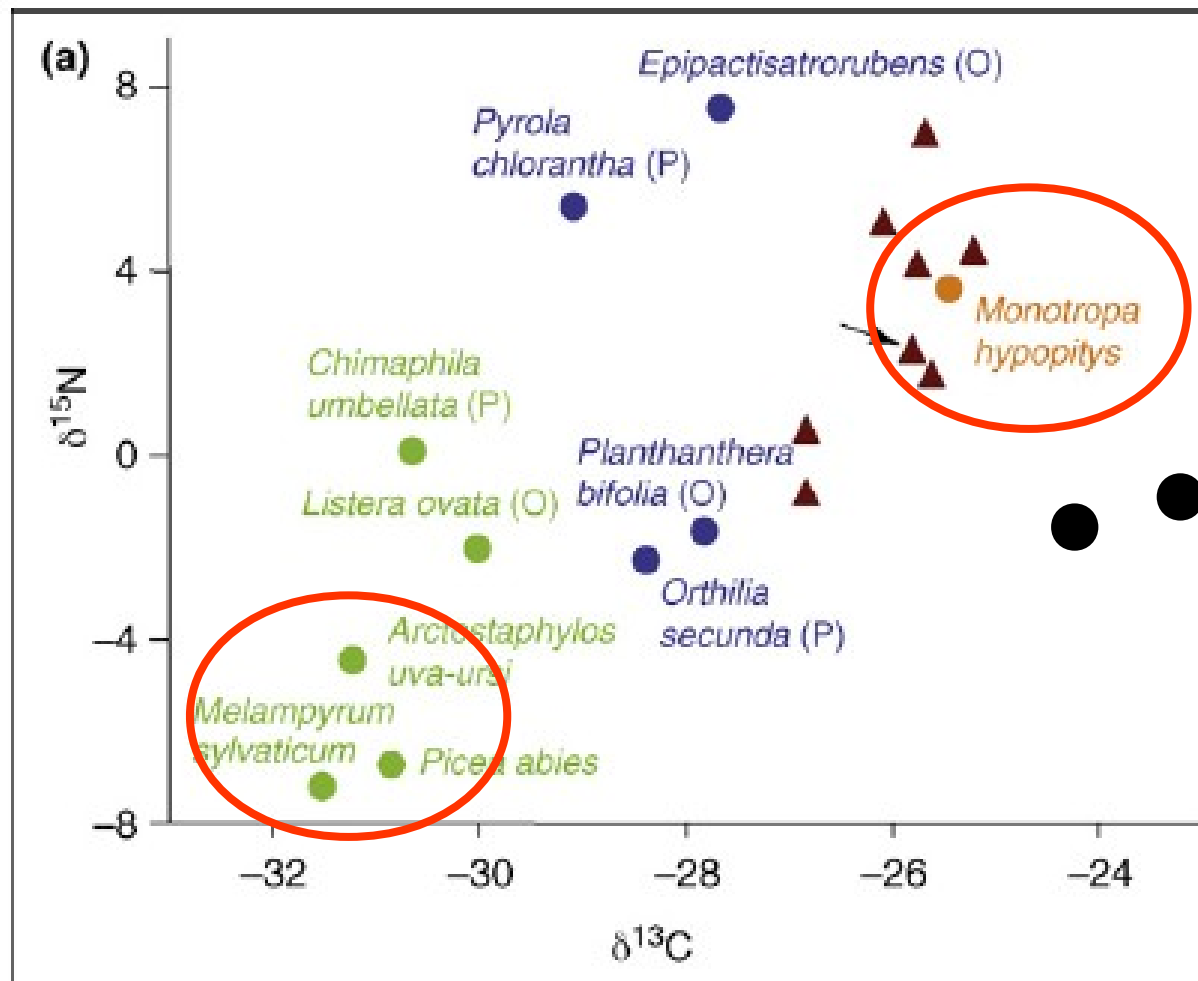
výhoda: žádné umělé experimentální ovlivnění, možnost zpracovat mnoho druhů, hodně vzorků

pro více informací doporučuji přednášku **Stabilní izotopy v biologii** (Šantrůčkovi)

ektomykorhizní i saprotrófní houby mají jiný izotopový signál než autotrofní rostliny



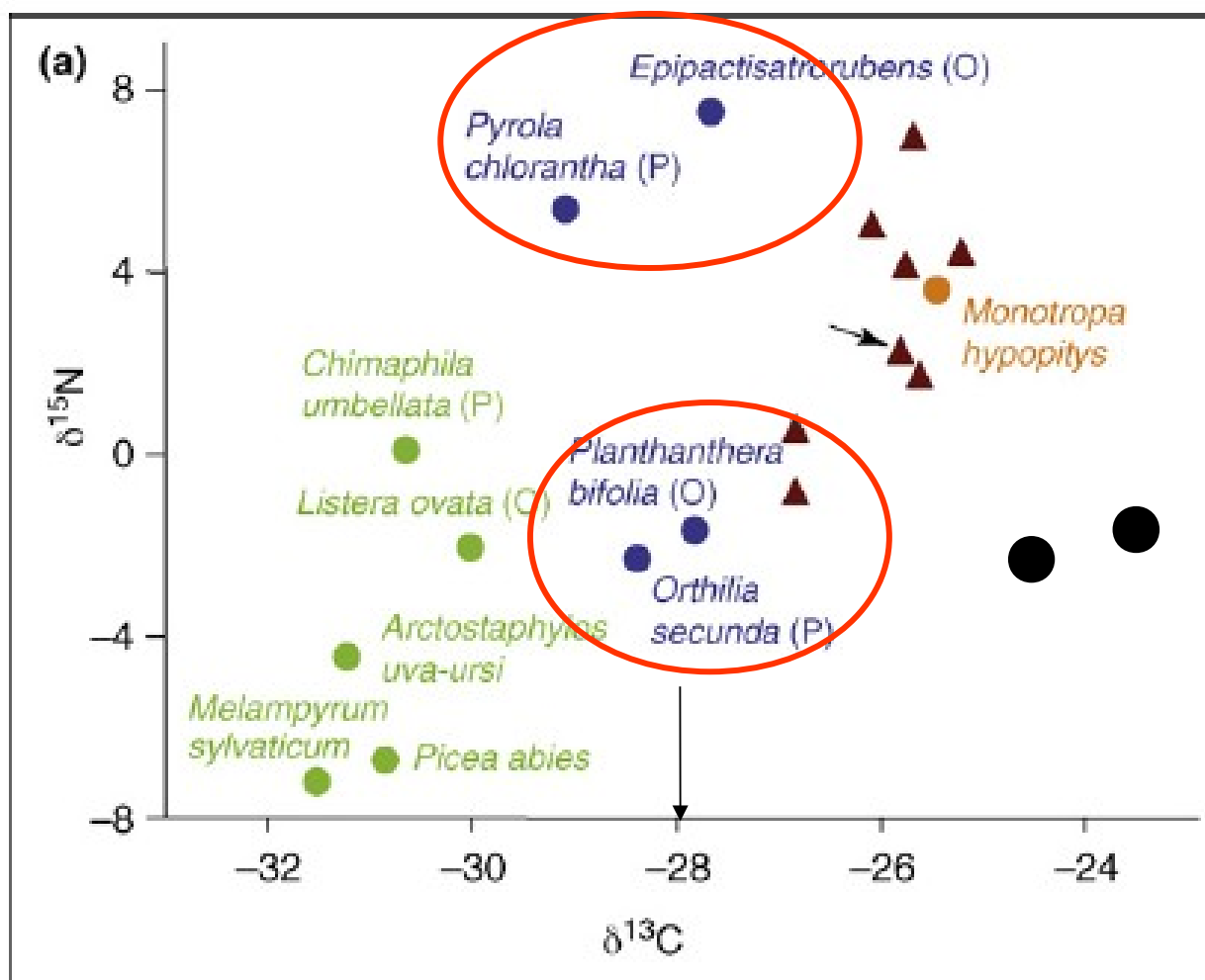
Takže když jím pouze ECM houbu, jsem obohacený v obou!
(..nemám, stejný zdroj C ani N jako ostatní autotrofové)



pokud se orchidej pojí s ECM houbami a zároveň fotosyntetizuje, tak je taky obohacená..

^{15}N podobné jejich, ^{13}C „zředěno“ vlastní fotosyntézou.

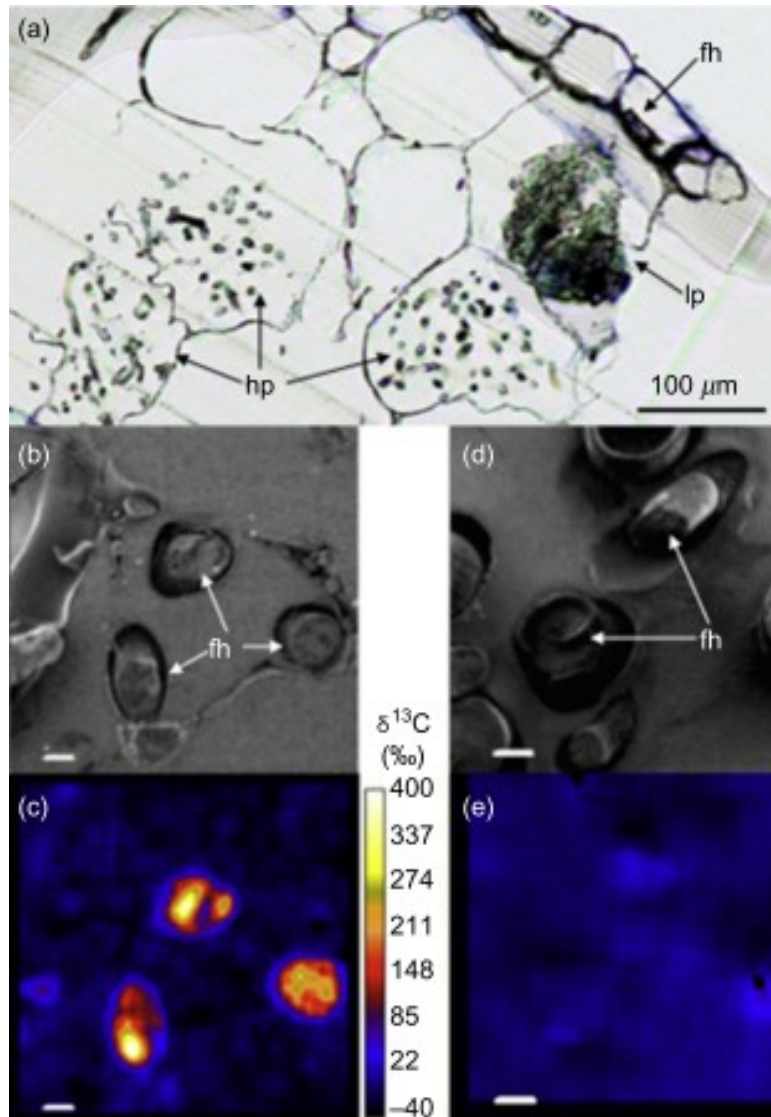
... přenos zatím experimentálně neprověřen



Selosse &
Roy 2009

Nové technologie jsou nutné...

high-resolution secondary ion mass spectrometry (nanoSIMS)
+ značení $^{13}\text{CO}_2$

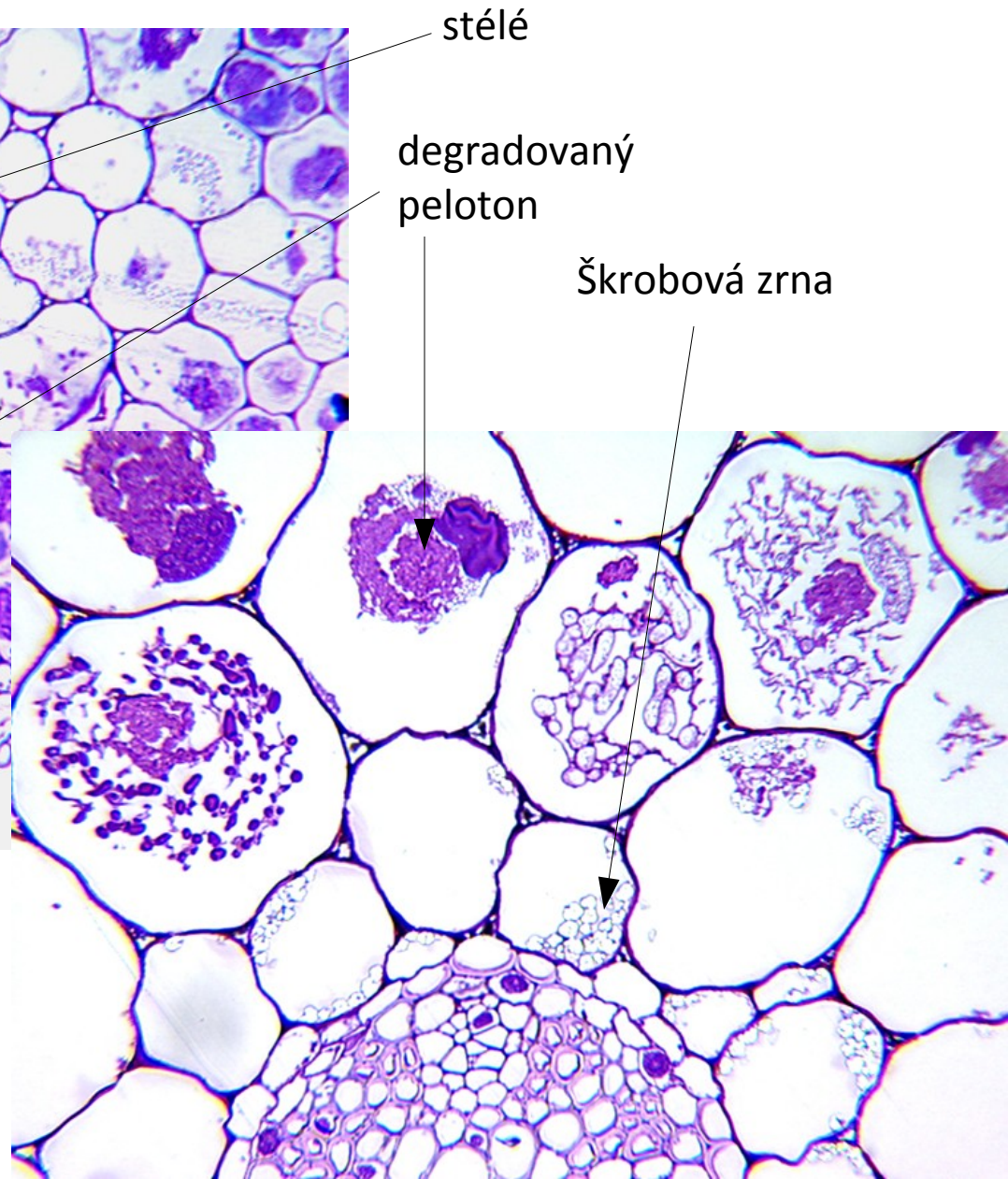
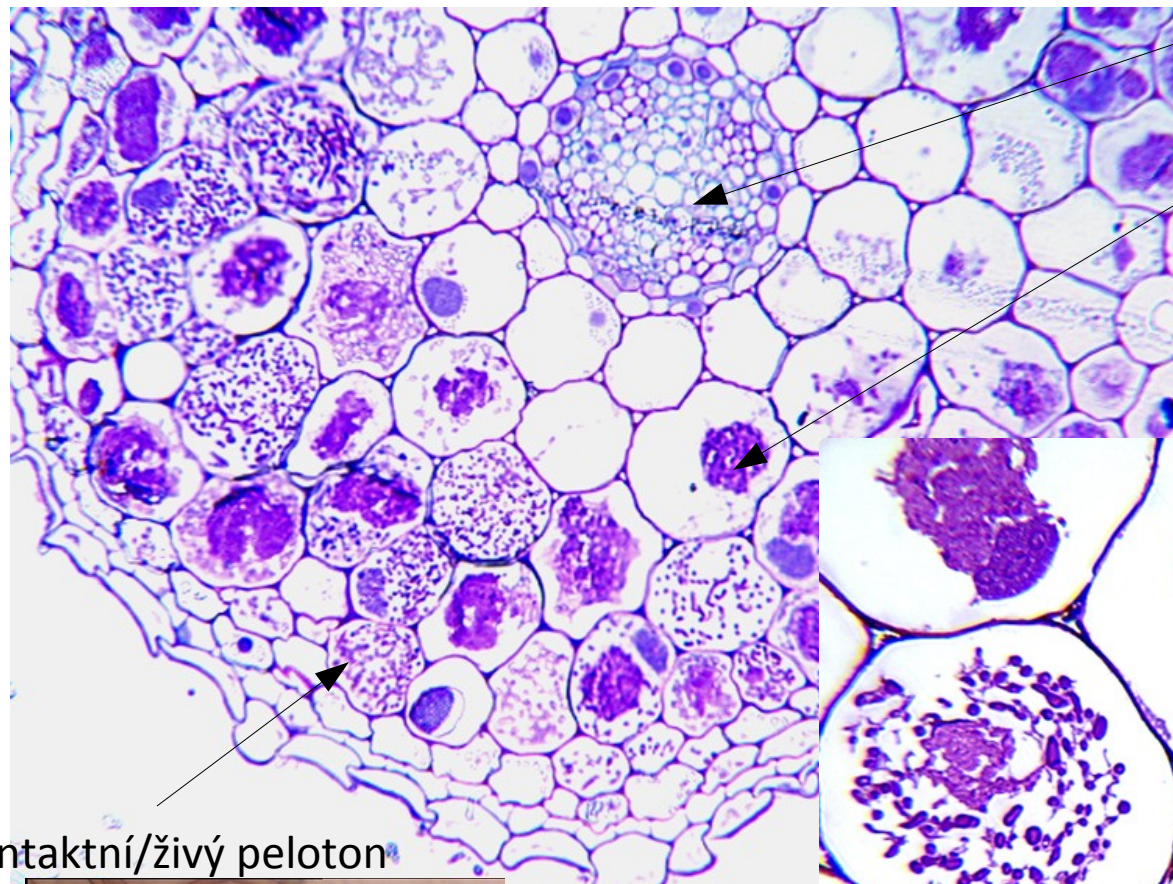


za 216 h žádný přenos
přes živé pelotony

Bougoure et al. 2013

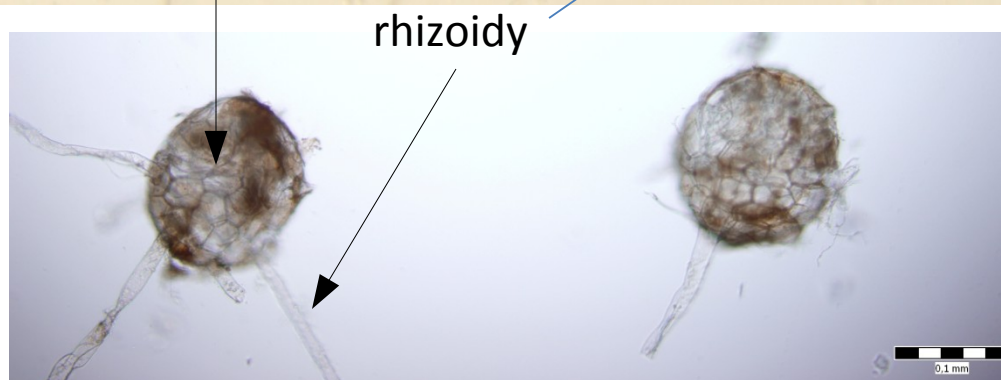
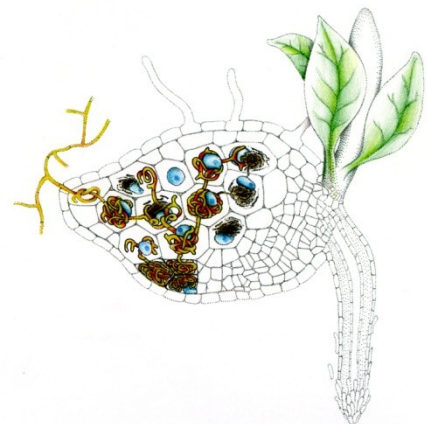
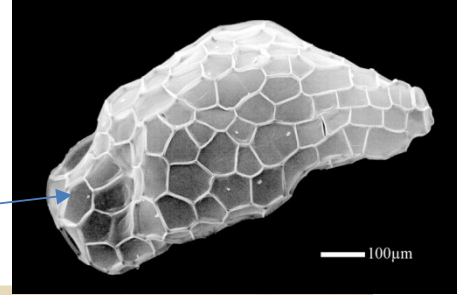
Orchideoidní mykorhiza – kořeny dospělých rostlin

Tvorba pelotonů v kořenové kůře



Protokormy – semenáče orchidejí

Pseudorchis albida, protokormy po dvou letech v půdě



Protokorm:
Semenáč s
rozlišenými
dělivými
meristémy pro
kořen a prýt

Protokormy – semenáče orchidejí (*Pseudorchis*)

apikální meristém



Budoucí list



nekróza