

Kartiranje tipov ektomikorize po anatomski metodi in s primerjavo s PCR-RFLP vzorci eksikatov gliv iz mikoteke GIS

Mapping of types of ectomycorrhizae by anatomical method and by comparisons of the PCR-RFLP database of exicates of fungal fruitbodies from the Herbarium and Mycotheca of the Slovenian Forestry Institute

Tine GREBENC¹, Hojka KRAIGHER²

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, tinegrebenc@hotmail.com

² Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, hojka.kraigher@gozdis.si

Izvleček: Micelij mikoriznih gliv v tleh predstavlja pomembno povezovalno mrežo za prenos vode in hranil ter vpliva na pestrost ostalih živih komponent v ekosistemih. Tipi ektomikorize se med seboj ločijo po morfoloških, fizioloških in ekoloških značilnostih, prav tako tudi njihov pomen za simbiotske rastline in delovanje ekosistema. Kartiranje tipov ektomikorize poteka s klasično morfološko-anatomsko metodo, katero dopolnjujemo z analizo polimorfizma dolžine restriksijskih fragmentov specifično pomnožene regije rDNK. Metoda je uporabna tudi kot pomoč pri taksonomskem in filogenetskem razvrščanju gliv – kot primer je naveden rod *Hydnum*.

Abstract: Mycorrhizal mycelium is the main network in forest soils for translocation of water and nutrients, influencing largely the diversity of all other biotic components in ecosystem. Types of ectomycorrhizae can be distinguished by their morphological, physiological and ecological characteristics, and equally so by their impacts on symbiotic plants and ecosystem functioning. Mapping of types of ectomycorrhizae is done by classical morpho-anatomical method and complemented by the analysis of restriction length polymorphism of specifically amplified rDNA. The method can be applied in taxonomical and phylogenetic studies of fungi, as presented on the genus *Hydnum*.

1. Uvod

Micelij mikoriznih gliv v tleh predstavlja pomembno povezovalno mrežo za prenos vode in hranil ter vpliva na pestrost ostalih živih komponent v ekosistemih (READ 1998). Ključne za pojavljanje in ohranjanje posameznih tipov ektomikorize pri izbranim rastlinskem partnerju so morfološke, fiziološke in ekološke značilnosti glive, ki se med posameznimi vrstami in sevi lahko razlikujejo (KRAIGHER 1996). Poznavanje vrstne sestave populacije mikoriznih gliv nam olajšuje razumevanje delovanja ekosistema (KRAIGHER, BATIČ, AGERER 1996), kot tudi sledenje spremembam, sukcesijam, ki se v preučevanem sistemu dogajajo. Pojavljanje trosnjakov mikoriznih gliv je odvisno

od cele vrste klimatskih in drugih dejavnikov, njihovo pojavljanje tudi ne ustreza pojavljanju mikoriznih korenin in micelija v tleh (*ibid.*), zato je kartiranje tipov ektomikorize bolj informativno.

Za določevanje glive v ektomikorizi je najbolj razširjena anatomska metoda (AGERER 1987-1999). Vedno bolj se uveljavljajo tudi molekularne metode, predvsem PCR-ITS-RFLP (verižna reakcija s polimerazo, v kombinaciji z analizo polimorfizma dolžine restriksijskih fragmentov notranjega transkripcijskega presledka) (GARDES & BRUNS 1993, KRAIGHER, AGERER, JAVORNIK 1996). S to metodo ugotavljamo vrsto glive v ektomikorizi s primerjavo restriksijskih vzorcev izbrane regije DNK mikorize ter ustreznega trosnjaka. Ta metoda se je pokazala

la kot hitrejša pri večjem številu vzorcev, ne more pa nadomestiti klasičnih postopkov, kar obravnavamo v nadaljevanju.

2. Material in metode

Vzorci trosnjakov ektomikoriznih gliv in tipov ektomikorize so bili nabrani na raziskovalnih ploskvah Gozdarskega Inštituta Slovenije (GIS) na Pokljuki in Pohorju, dodatni vzorci za rod *Hydnum* pa tudi na nekaterih drugih lokacijah po Sloveniji, Italiji in na Bavarskem, saj se znotraj vrst tega rodu pojavlja precejšnja variabilnost ITS regije v ribosomalni DNK (AGERER, KRAIGER, JAVORNIK 1996). Tipe ektomikorize smo določili in opisali po anatomski metodi (AGERER 1987-1999) na volumetrično odvzetih vzorcih tal (274 ml, 0-18 cm globoko), v katerih smo analizirali vse korenine oziroma mikorizne korenine in dodatno na vzorcih tal, odvzetih neposredno pod trosnjaki gliv, katerih mikoriza še ni bila opisana (podrobnejši opis metode je prikazan v KRAIGER 1996). Vsi vzorci so herbarizirani in shranjeni v Herbariju in mikoteki GIS, vzorci iz tujine pa v Herbariju Inštituta za sistematsko botaniko LMU v Münchnu.

PCR-ITS-RFLP metodo (GARDES & BRUNS 1993, KRAIGER, AGERER, JAVORNIK 1996), ki obsega ekstrakcijo DNK, pomnožitev ITS regije z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za zaprtotrosnice ali prostotrosnice, encimsko cepljenje produkta pomnoževanja in ločevanje fragmentov z elektroforezo, smo uporabili za analize vzorcev trosnjakov in shranjenih ektomikoriznih korenin. Elektroferograme smo analizirali z računalniškim programom Taxotron® (GRIMONT 1998). V primerih, ko ta metoda ni dovolj informativna ali če želimo podrobneje študirati filogenetske odnose, je potrebno sekvenciranje celotne ali dela ITS regije, mitohondrijske DNK idr. (BRUNS, WHITE, TAYLOR 1991, MARTIN, DIEZ, MANJON 1999).

3. Rezultati in diskusija

V Sloveniji smo do leta 1999 na ca 100.000 mikoriznih koreninah opisali nekaj več kot 60 tipov ektomikorize (KRAIGER 1999), od teh smo lahko do vrste določili ali podrobno opisali 30 tipov, pri nekaj tipih smo lahko določili le skupino ali rod, 20 tipov ektomikorize je potrebno še podrobno karakterizirati. Zaradi velike pestrosti tipov ektomikorize ter njihovega pomena za uspevanje simbiotskih rastlin je natančna identifikacija vrste glive v simbiozi pomembna, anatomsko – morfološka metoda identifikacije in karakterizacije pa je izjemno zamudna. Zato od leta 1993 dalje to metodo dopolnjujemo z molekularno metodo identifikacije tipov ektomikorize, od leta 1999 dalje pa tudi s primerjavo z bazo podatkov PCR-ITS-RFLP vzorcev, pridobljenih iz trosnjakov gliv iz istih raziskovalnih ploskev.

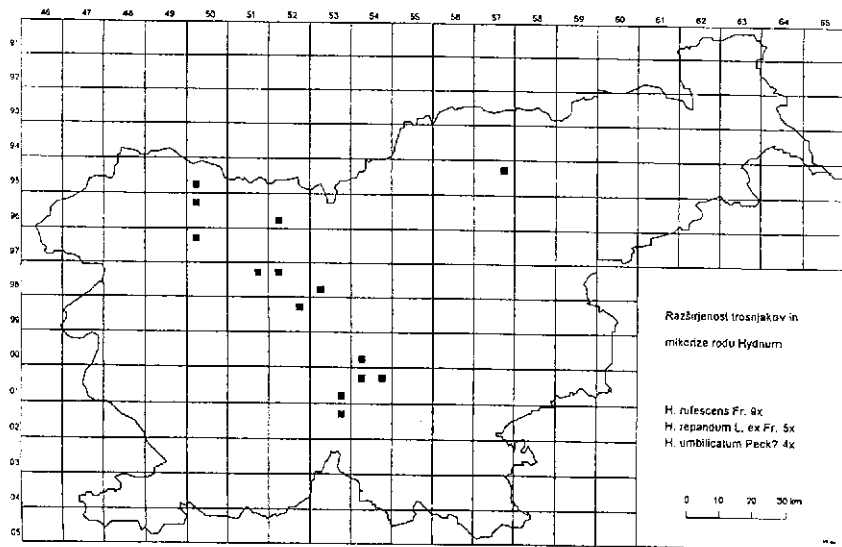
Doslej smo DNK ekstrahirali iz več kot dvesto herbariziranih trosnjakov (GREBENC, KRAIGER 2000). Pri 199 primerkih je bila verižna reakcija s polimerazo uspešna, produkte pomnoževanja smo nato cepili s tremi restriksijskimi encimi – *Hinf*I, *Taq*I in *Mbo*I. Kombinacija restriksijskih vzorcev vseh treh encimov je shranjena v bazi podatkov, ki omogoča stalno dopolnjevanje z novimi znanimi vzorci trosnjakov ali ektomikoriz, kot tudi primerjavo s še ne določenimi oziroma neznanimi tipi ektomikorize. Z izbranimi restriksijskimi encimi lahko vzorce gliv razlikujemo na nivoju vrst. V nekaterih primerih se dolžine fragmentov razlikujejo tudi med tipom in varieteto znotraj posamezne vrste (GREBENC, PILTAVER, KRAIGER 2000). Pri primerjavi restriksijskih vzorcev in pri izdelavi dendrograma smo upoštevali napako metodologije ter odstopanja v dolžini ITS regije znotraj iste vrste (KAREN & al. 1997), na primer pri *Hydnum* spp. nabranih na različnih lokacijah.

Rod *Hydnum* je po Friesovem konceptu (AINSWORTH, SPARROW, SUSSMAN 1973) ob-

segal vse vrste z navzdol usmerjenimi bodicami, tudi vrste, ki danes spadajo v povsem druge družine (tipska vrsta *Hydnum imbricatum* L. ex Fr.). S.F. Gray (1821) je razdelil Friesov rod *Hydnum* na šest novih, v rod *Hydnum* pa je uvrstil le *Hydnum imbricatum* (danes *Sarcodon imbricatus* (L.:Fr.) Karst.). Leta 1878 je Quélet *H. imbricatum* uporabil kot tip za rod *Sarcodon*, zato se še danes lahko obe rodovni imeni pojavita kot sinonima. Po zapisih Zveze gobarskih družin v Sloveniji (POLER 1998) se pri nas pojavljajo vrste oz. oblike *H. albidum* Peck., *H. repandum* (L.) Fr., *H. repandum* fo. *amarum* Vrščaj, *H. rufescens* Schff.: Fr. in *H. umbilicatum* Peck. Makroskopski in mikroskopski znaki za delitev teh vrst niso prepričljivi, saj Moser (JÜLICH 1984) loči samo tri vrste, nekateri drugi av-

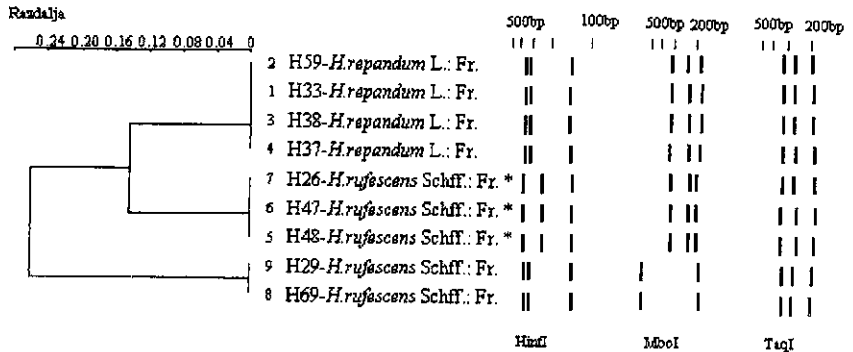
torji pa le *H. repandum* var *repandum* L.:Fr. in *H. repandum* var *rufescens* (Fr.) Barla. (BON 1987). Predvsem je vprašljiva vrsta *H. umbilicatum*, katere Moser ne pozna in naj bi se pojavljala predvsem v Severni Ameriki (www.mykoweb.com/CAF/species/Hydnum_umbilicatum.html).

Zato smo pri določanju tipov ektomikorize od prvega podrobnega opisa dalje (AGERER, KRAIGHER, JAVORNIK 1996) primerjali tudi PCR-ITS-RFLP vzorce. Pri slednjih smo opisali polimorfizem ITS regije znotraj vrste ter s tem opozorili na možnost napak pri identifikaciji tipov ektomikorize zgolj z molekularno metodo, torej sklepanje na večjo pestrost od dejanske ali na napačno identifikacijo tipa ektomikorize zgolj z molekularno metodo. Na primeru tipov ektomikorize vrst *H. repan-*



Sl. 1: Vzorceenje ektomikorize in trosnjakov rodu *Hydnum* (ježki) v Sloveniji za sestavo baze podatkov PCR-ITS-RFLP vzorcev. Na posamezni lokaciji je bilo nabranih več trosnjakov predvidoma iste vrste ježkov, število vzorcev je vpisano v legendi.

Fig.1: Locations of sampling of ectomycorrhizae and fruitbodies from genus *Hydnum* in Slovenia. Samples were used for build up of the PCR-ITS-RFLP database. More than one sample of fruitbodies from the same species of *Hydnum* were collected on marked locations.



Sl. 2: Dendrogram za izbrane vzorce trosnjakov iz rodu *Hydnum* s pripadajočimi restrikcijskimi vzorci za encime *HinfI*, *MboI* in *TaqI*.

Fig. 2: Dendrograme for selected samples of sporocarps belonging to genus *Hydnum* with corresponding restriction patterns for *HinfI*, *MboI* and *TaqI* endonuclease.

dum in *H. rufescens* je uporaba molekularnih metod edini način za ločevanje, saj se tipa samo po anatomskih lastnostih med sabo ne ločita (AGERER, KRAIGER, JAVORNIK 1996).

Za razjasnitev stanja pri rodu *Hydnum* smo začeli z vzorčenjem trosnjakov na več raziskovalnih ploskvah in drugih lokacijah po Sloveniji (Slika 1). Trenutni rezultati molekularnih analiz kažejo, da je vrsta *H. repandum* homogena, znotraj makroskopsko in mikroskopsko določene vrste *H. rufescens* pa se pojavljata dva različna restrikcijska vzorca (Slika 2), od katerih bi vzorci, označeni z zvezdico (*), lahko pripadali vrsti (oziroma drugi taksonomski (pod)enoti) *H. umbilicatum*, saj so trosnjaki nekoliko manjši od ostalih vzorcev vrste *H. rufescens* (rezultati meritev niso prikazani).

Sklepamo lahko, da je molekularna metoda identifikacija in karakterizacije tipov ektomikorize s PCR-ITS-RFLP vzorcem

pomemben pripomoček pri določanju tipov ektomikorize, vendar je pri njej potrebno upoštevati polimorfizem ITS regije znotraj vrste, torej je potrebno zasnovati bazo podatkov na vzorcih trosnjakov in tipov ektomikorize iz istih lokacij. Pridobljeni podatki lahko prispevajo tudi k razjasnitvi taksonomskega položaja vrst, kot prikazujemo na primeru rodu *Hydnum*.

Zahvala

Raziskavo sta financirala Ministrstvo za znanost, šolstvo in šport in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS v okviru projekta št. L4-1254 in programa P0-0501-0404-01. Andreju Piltaverju se zahvaljujemo za determinacijo večine trosnjakov mikoriznih gliv v Mikoteki in herbariju GIS, izvedenih v okviru predhodnih projektov.

4. Viri

- AGERER, R. (Ed.) 1987-1999: Colour atlas of ectomycorrhizae, 1. – 11. izdaja. Einhorn Schwabisch Gmund.
 AGERER, R., KRAIGER, H., JAVORNIK, B. 1996: Identification of ectomycorrhizae of *Hydnum rufescens* on Norway spruce and the variability of the ITS region of *H. rufescens* and *H. repandum* (Basidiomycetes). Nova Hedwigia 63 (1-2): 183-194.

- AINSWORTH, G. C., SPARROW, F. K., SUSSMAN, A.S. 1973: The fungi, an advanced treatise. Academic Press New York and London.
- BRUNS, T. D., WHITE, T. J., TAYLOR, J. W. 1991: Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- BON, M. 1987: Mushrooms and toadstools of Britain and north-western Europe. Hodder & Stoughton, London, 361pp.
- GARDES, H. & BRUNS, T. D. 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.
- GREBENC, T. & KRAIGHER, H. 2000: Postavitev baze podatkov PCR-ITS-RFLP za mikorizne glive in tipe ektomikorize na smreki iz trajne raziskovalne ploskve GIS na Pokljuki. In: H. Kraigher & I. Smolej (eds.): Rizosfera. Strokovna in znanstvena dela 118, Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana. pp. 179-190.
- GREBENC, T., PILTAVER, A., KRAIGHER, H. 2000: Establishment of a PCR-RFLP library for basidiomycetes, ascomycetes and their ectomycorrhizae on *Picea abies* (L.) Karst. *Phyton (Austria)* 40 (4): 79-82.
- GRIMONT, P. A. D. 1998: Taxotron user's manual. Institute Pasteur, Paris. 180 pp.
- JÜLICH, W. 1984: Die Nichtblätterpilze, Gallertpilze und Bauchpilze, Aphylophorales, Heterobasidiomycetes, Gastromycetes. Band IIB/1 – Basidiomyceten – 1. Teil, Gustav Fisher Verlag – Stuttgart, New York.
- KÄREN, O., HÖGBERG, N., DAHLBERG, A., JONSSON, L., NYLUND, J-E- 1997: Inter – and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytol.* 136: 313-325.
- KRAIGHER, H. 1999: Diversity of types of ectomycorrhize on Norway spruce in Slovenia. *Phyton (Austria)*, 39 (3): 199-202.
- KRAIGHER, H. 1996: Tipi mikorize – taksonomija, pomen in aplikacije. *Zbornik gozd. in les.* 49: 33-66.
- KRAIGHER, H., AGERER, R., JAVORNIK, B. 1996: Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterised by anatomical and molecular tools. *Mycorrhiza* 5: 175-180.
- KRAIGHER, H., BATIČ, F., AGERER, R. 1996: Types of ectomycorrhizae and mycobioremediation of forest site pollution. *Phyton (Austria)* 36 (3): 115-120.
- MARTIN, M. P., DIEZ, J., MANJON, J. L. 1999: Molecular ecology of ectomycorrhizae. In: COST E6 EU-ROSILVA workshop: Root – soil interactions in trees. *Gozd Martuljek, September 1999, Abstracts*, p. 13, GIS, Ljubljana.
- POLER, A. (Ed.), 1998: Seznam gliv Slovenije. Zveza gobarskih društev Slovenije, Ljubljana.
- READ, D. J. 1998: Plants on the web. *Nature* 386: 22-23.
- Domača stran na medmrežju: www.mykoweb.com/CAF/species/Hydnum_umbilicatum.html