



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

---



**METODY *IN VITRO* KULTIVACE**  
**ARBUSKULÁRNÍCH**  
**MYKORHIZNÍCH HUB**

Bakalářská práce

**Olga Miklíčková**

**Vedoucí práce: RNDr. Milan Baláž, Ph.D.**

**Brno 2013**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Olga Mikličková  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav botaniky a zoologie

**Název práce:** Metody *in vitro* kultivace arbuskulárních mykorhizních hub

**Studijní program:** Chemie

**Studijní obor:** Chemie se zaměřením na vzdělávání  
Biologie se zaměřením na vzdělávání

**Vedoucí práce:** RNDr. Milan Baláž, Ph.D.

**Akademický rok:** 2012/2013

**Počet stran:** 34

**Klíčová slova:** Arbuskulární mykorhiza, *in vitro*, kultivace, *Glomus*, *Rhizophagus*

# Bibliographic Entry

**Author:** Olga Mikličková  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Botany and Zoology

**Title of Thesis:** Methods of *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi

**Degree programme:** Chemistry

**Field of Study:** Chemistry Education  
Biology Education

**Supervisor:** RNDr. Milan Baláž, Ph.D.

**Academic Year:** 2012/2013

**Number of Pages:** 34

**Keywords:** Arbuscular mycorrhiza, *in vitro*, cultivation, *Glomus*; *Rhizophagus*

## Abstrakt

Arbuskulární mykorrhizní houby jsou všeobecně rozšířené organismy žijící v symbióze s kořeny rostlin. Jsou to obligátně biotrofní organismy, které i při kultivaci *in vitro* vyžadují přítomnost kořenů hostitelské rostliny. Cílem této práce bylo pomocí dvou technik převést dva houbové izoláty patřící do okruhu *Glomus* (*Rhizophagus*) *intraradices* agg. do monoxenické *in vitro* kultury rostoucí s Ri-transformovanými kořeny čekanky obecné (*Cichorium intybus*). Zatímco pomocí převodu s využitím kolonizovaných segmentů kořenů byla izolace úspěšná, v případě převodu přes spory selhala. Izoláty získané v této práci byly již několikrát přepasážovány a vyznačují se velmi dobrým růstem. Využití mohou nalézt nejen v následném vědeckém výzkumu, ale i při produkci vysoce kvalitního inokula těchto hub pro komerční účely.

## Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi are widespread organisms living in the intimate symbiosis with plant roots. They are obligate symbionts, requiring the presence of host plant roots even if cultivated *in vitro*. The aim of this work was to transfer two fungal isolates from the aggregate species *Glomus* (*Rhizophagus*) *intraradices* into *in vitro* monoxenic culture with Ri-transformed roots of *Cichorium intybus*, using two different transfer techniques. While using the method of colonized roots segments the transfer was successful, the method using the spores failed. The isolates obtained are cultivated for several months and they still do grow vigorously. They can be used not only in research, but also for the commercial production of high quality inocula.

Vysoká škola: Masarykova univerzita

Fakulta: Přírodovědecká

Ústav botaniky a zoologie

Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

pro: Olgu Miklíčkovou, učo 376022

obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání

Název tématu :

**Metody *in vitro* kultivace arbuskulárních mykorhizních hub**  
(Methods of *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi)

Zásady pro vypracování:

Cílem práce vytvoření detailních protokolů metod používaných při *in vitro* kultivacích arbuskulárních mykorhizních (AM) hub. Uvedeny budou protokoly přípravy transformovaných kořenů hostitelských AM rostlin, izolace AM hub ze spor a kořenových segmentů a syntéza a následné udržování již vytvořených kultur AM asociací. Tyto metody budou prakticky využity při realizaci experimentu, který bude nedílnou součástí bakalářské práce a jehož cílem bude kvantifikovat rozvoj AM asociace mezi transformovanými kořeny tří vybraných druhů AM hostitelských rostlin s vybranými zástupci agregátního druhu *Glomus intraradices*. Rešeršní část pak bude zahrnovat zejména studie realizované pomocí *in vitro* kultivovaných AM hub a rovněž případné komerční využití takto kultivovaných hub.

Rozsah grafických prací:

Práce bude zpracována na PC, včetně grafického vyhodnocení.

Rozsah průvodní zprávy:

12ti bodové písmo, 20-30 stran včetně tabulek, obrázků a grafů.

Seznam odborné literatury:

SMITH SE, READ DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edition. Academic Press, London.  
DECLERCK S, STRULLU D-G, FORTIN J-A (Eds.). 2005. In Vitro Culture of Mycorrhizas.  
Springer, Berlin.

Odborné články budou vyhledány pomocí webových databází, zejména pomocí WoS.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Milan Baláž, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce:

19. prosince 2012

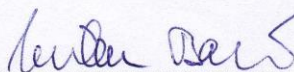
Termín odevzdání bakalářské práce:

Dle termínu příslušného akademického roku.

L.S.


Vyjádření vedoucího oddělení:

S tématem předložené práce souhlasím: Doc. Vít Čižmár, Ph.D.



vedoucí bakalářské práce

V Brně dne 19. prosince 2012



ředitel ústavu

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta  
4020 ÚSTAV BOTANIKY A ZOOLOGIE  
611 37 Brno, Kotlářská 2



převzal (student)

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému vedoucímu RNDr. Milanu Balážovi, Ph.D. za odbornou pomoc a vstřícný přístup a dále pak Mgr. Martinu Rozmošovi za odbornou pomoc a trpělivý přístup.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 10. května 2013

.....

Olga Miklíčková

## OBSAH:

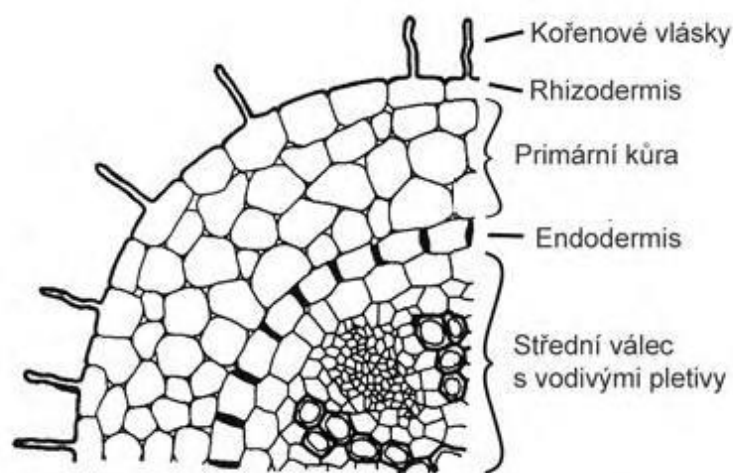
1.	Literární přehled .....	9
1.1.	Charakteristika mykorhizních symbióz .....	9
1.2.	Arbuskulární mykorhiza .....	10
1.3.	Životní cyklus arbuskulárních mykorhizních hub .....	12
1.4.	Kultivace AM hub v podmínkách <i>in vivo</i> .....	13
1.4.1.	Záchytné kultury .....	14
1.5.	Kultivace AM hub v podmínkách <i>in vitro</i> .....	15
1.5.1.	Metody využívající celé rostliny .....	15
1.5.2.	Transformované hostitelské rostliny .....	18
1.5.3.	Kultivační média .....	21
1.5.4.	Metody izolace AM hub .....	22
1.5.5.	Ne všechny AM houby umíme kultivovat v podmínkách <i>in vitro</i> .....	24
2.	Materiál a metody .....	26
2.1.	Příprava kultivačních médií .....	26
2.2.	Pokus 1 – izolace AM hub z kořenových segmentů .....	27
2.3.	Pokus 2 – izolace AM hub metodou povrchové dezinfekce spor .....	28
3.	Výsledky .....	30
4.	Diskuse .....	32
5.	Literatura .....	33



## 1. Literární přehled

### 1.1. Charakteristika mykorhizních symbióz

Termínem mykorhizní symbióza označujeme soužití kořenů rostlin s půdními houbami. Toto soužití obou partnerů, tedy houby a rostliny, je obvykle vzájemně prospěšné, tedy mutualistické. Symbiotická houba typicky zlepšuje minerální výživu rostliny (zejména dusíkem a fosforem) a naopak rostlina houbě poskytuje organické látky (sacharózu). Pojmem mykorhiza označujeme nejen symbiotický vztah, ale někdy také společný orgán, který vzniká po kolonizaci kořene mykorhizní houbou. Vzhledem ke značnému rozšíření mykorhizních symbióz pak lze říci, že rostliny v přírodě většinou nemají kořeny, ale mykorhizy. Slovo mykorhiza je složeno z řeckých slov *mykés*, *mykétas* (houba, hřib) a *rhíza*, *ríza* (kořen) a doslova znamená „houbokořen“. Vlákná mykorhizních hub propojují půdní prostředí s vnitřním prostorem kořene, kde kolonizují kořenovou pokožku (rhizodermis), což je nejsvrchnější vrstva buněk na povrchu kořene a primární kořenovou kůru, což jsou vrstvy buněk pod kořenovou pokožkou ohraničené endodermis (obr. 1). Do endodermis ani do středního válce kořene, který obsahuje vodivá pletiva mykorhizní houby nepronikají. Mykorhizní houby patří mezi houby stopkovýtrusé (Basidiomycota), vřeckovýtrusé (Ascomycota) a Glomeromycota.



**Obrázek 1:** Anatomická stavba kořene (Gryndler et al. 2004).

Mykorhizní symbióza je charakteristická pro cévnaté rostliny, avšak kolonizace mykorhizními houbami byly popsány i u nižších rostlin jako jsou játrovky (Marchantiophyta) (Bidartondo a Duckett 2010) a hlevíky (Anthoceroophyta) (Schussler, 2000) a také například u kaprad'orostů, které tvoří arbuskulární mykorhizy jak u spororofytů, tak u prvoklíčků (Dhillion 1993). Velmi často jsou mykorhizní i zástupci čeledí plavuňovitých (*Lycopodiaceae*) a jazykovitých (*Ophioglossaceae*).

Mykorhizní symbiózy lze rozdělit do dvou hlavních kategorií podle anatomických charakteristik na endomykorhizny, kdy houba proniká do vnitřního prostoru buněk kořene hostitele. Do této skupiny řadíme arbuskulární, erikoidní a orchideoidní mykorhizní symbiózu. Pro endomykorhizy je charakteristické, že při kolonizaci kořene houbou nedochází ke změně morfologie ani anatomie kořene. Druhou kategorií jsou ektomykorhizy, kdy se houba nachází pouze v mezibuněčných prostorech a na povrchu kořene, kdy vytváří tzv. hyfový plášť, což se projevuje na morfologii kořene (Gryndler et al. 2004).

## **1.2. Arbuskulární mykorhiza**

V této práci se budu podrobněji zabývat arbuskulární mykorhizní (AM) symbiózou, která je fylogeneticky nejstarším typem mykorhizní symbiózy. Arbuskulární mykorhiza se vyskytuje u 80 % druhů cévnatých rostlin žijících dnes na Zemi, což je asi 11 000 rodů zahrnujících 225 000 druhů (Stubblefield et al. 1987). Pro AM jsou charakteristické bohatě větvené útvary nazývané arbuskuly vznikající uvnitř buněk hostitelských rostlin. Ty daly tomuto typu mykorhizy také jméno (Gryndler et al. 2004).

Mycelium AM hub je nepřehrádkované (cenocytické), je tvořeno jedinou obrovskou větvenou buňkou obsahující v proudící cytoplazmě velké množství jader. Toto mycelium žije biotrofně, což znamená, že získává výživu z kořene živé hostitelské rostliny. Před tím ale musí nejprve kořen kolonizovat, tedy překonat chemické obranné mechanismy rostliny, kterými se tato rostlina chrání před mikroorganismy žijícími v půdě. Houba musí nejprve prorůst do nitra buněk kořenové kůry přes jejich buněčnou stěnu. Dále musí vytvořit struktury, které jí budou pomáhat získávat od hostitele látky

bohaté na energii, jimiž se živí, ovšem jen do té míry, aby nesnížila jeho životaschopnost přílišným odčerpáním jeho energie (Gryndler et al. 2004).

Mycelium AM hub lze z anatomického hlediska rozdělit na vnitrokořenovou a mimokořenovou část, které se funkčně liší. Vnitrokořenové mycelium vzniká v rhizodermis a primární kůře kořenů hostitelských rostlin při kolonizaci kořene hyfami AM hub. Od místa průniku houby do kořene roste kořenové mycelium jak ve směru růstu kořene, tak i proti směru jeho růstu. Kořenové mycelium je tvořeno tlustými hyfami, které ve vnitřním prostoru buněk kořene hostitele tvoří „stroměčkovité“ větvené útvary – arbuskuly (z lat. *arbuscula*, stroměček). Arbuskuly slouží k látkové výměně mezi rostlinou a houbou, přičemž jsou od vnitřního prostoru buňky odděleny cytoplazmatickou membránou hostitele. Vzniká tak tzv. periarbuskulární membrána. Mezi větvemi arbuskuly a periarbuskulární membránou se vytváří apoplastický prostor, který nazýváme prostorem mezilehlým. Tento prostor je charakteristický svojí kyselostí. Za okyselováním je s největší pravděpodobností zodpovědný určitý typ rostlinného enzymu  $H^+$ -ATPázy nacházející se v periarbuskulární membráně (Guttenberger 2000). Tento enzym čerpá vodíkové ionty zevnitř buňky hostitele do mezilehlého prostoru a to se projeví poklesem pH.

Dalšími vnitrokořenovými útvary jsou vezikly (z lat. *vesicula*, měchýřek) což jsou kulovité, elipsoidní nebo i nepravidelné útvary. Funkce veziklů není známa, nejspíše slouží jako zásobárna látek. Arbuskulární mykorhiza byla dříve nazývána vezikulo-arbuskulární mykorhizou, toto označení však bylo opuštěno, protože některé arbuskulární houby, například zástupci rodu *Gigaspora*, vezikly netvoří. V případě některých druhů AM hub jako je *Glomus intraradices* dochází v prostoru kořenového mycelia také k tvorbě vnitrokořenových spor.

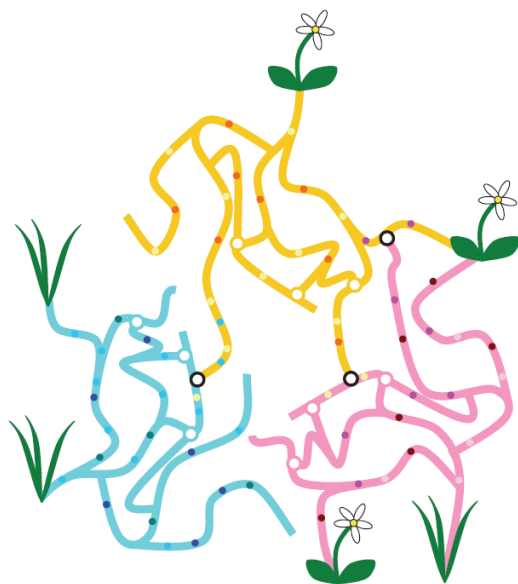
Mimokořenové mycelium AM hub je tvořeno hyfami, které prorůstají půdou, odkud čerpají živiny a dále je transportují do kořenů hostitelské rostliny, čímž zlepšují její minerální výživu zejména fosforem a dusíkem. Mycelium má v půdě jen krátkou životnost, jen asi 5–6 dnů, pak je nahrazováno hyfami novými (Staddon et al. 2003). Na myceliu AM hub se tvoří rozmnožovací orgány – spory. Vznikají u většiny druhů na mimokořenovém myceliu, jsou tedy lokalizovány v půdě. U některých druhů hub však mohou spory vznikat i na kořenovém myceliu mezi kortikálními buňkami hostitelské

rostliny, to je časté u druhů s drobnými sporami jako je například *Glomus intraradices* nebo *G. manihotis* (Gryndler et al. 2004). Spory AM hub vznikají nepohlavní cestou, podle mykologické terminologie se tedy jedná o azygospory. Současně jsou silnostěnné a schopné přečkávat nepříznivé podmínky, proto jsou současně považovány za chlamydospory.

### **1.3. Životní cyklus arbuskulárních mykorhizních hub**

Životní cyklus AM houby začíná vyklíčením spor. Spory AM hub pro klíčení často vyžadují předchozí klidové období, některé však mohou pro uvolnění dormance vyžadovat také stratifikaci, kdy jsou vystaveny teplotě 2–5 °C (Juge et al. 2002) po dobu několika dnů až týdnů. Během této doby spory prodělají změny nezbytné k jejímu vyklíčení. Aktivují se biochemické pochody a mobilizují se energetické zásoby, které jsou uloženy ve spoře ve formě tukových kapének. Postupně dochází k rozrušení buněčné stěny spory a k růstu klíčící hyfy, která je schopna kolonizovat kořen hostitelské rostliny. Spory jsou schopny vyklíčit v nepřítomnosti hostitelské rostliny, ale další růst mycelia je omezen na dobu maximálně 20–30 dnů (Bonfante a Perotto 1995). K lokalizaci hostitelského kořene využívají AM houby signální látky, které jsou do půdy těmito kořeny uvolňovány. Předpokládá se, že takto se uplatňují mimo jiné strigolaktony (Akiyama et al. 2005) a mastné kyseliny (Nagahashi a Douds 2011). Při kontaktu mycelia s kořenem se nejdříve vytváří na povrchu kořene terček (apresorium), což je struktura, která pevně přilne k povrchu kořene a ze které vyrůstá jedna nebo několik hyf skrz rhizodermis do primární kořenové kůry. Proces kolonizace kořene hostitele arbuskulární mykorhizní houbou je regulován kaskádou geneticky řízených pochodů. Při vzniku mykorhizy musí být odkloněny obranné reakce hostitele tak, aby jimi nebyla ohrožena mykorhizní houba, ale aby při tom zůstala zachována obrana kořene proti jiným půdním mikroorganismům. Poté se vytvoří první arbuskuly a houba se začíná dále šířit v kořenové kůře hostitele. Tvoří se další mezibuněčné hyfy, arbuskuly a dále i vezikly nebo vnitrokořenové spory. Prostor kořenové kůry kolonizovaný prostřednictvím apresoria nazýváme kolonizační jednotkou. Po úspěšném vytvoření mykorhizy, kdy je AM houba napojena na energetické zdroje rostliny dochází k rozvoji mimokořenového mycelia a kolonizaci dalších kořenů. Důležitou vlastností AM hub je schopnost tvořit anastomózy, což jsou funkční cytoplazmatická spojení,

kterými mohou procházet jednak živiny, ale i orgány jako jsou jádra. Anastomózovat mohou jednak hyfy pocházející ze stejného mycelia, ale i z různých mycelií stejného druhu. V tomto případě však musí být mycelia vzájemně kompatibilní, což předpokládá určitou genetickou podobnost (obr. 2), (Croll et al. 2009), (Young 2009).



**Obrázek 2:** Anastomózy mezi geneticky odlišnými mycelii napojenými na více různých hostitelských rostlin. Díky těmto propojením mohou živiny, ale i orgány procházet cytoplazmou na velké vzdálenosti (Young 2009).

#### 1.4. **Kultivace AM hub v podmínkách *in vivo***

Vzhledem k tomu, že AM houby jsou obligátně biotrofní organismy, je jediným možným způsobem kultivace pěstování v přítomnosti živých kořenů hostitelských rostlin. Bylo otestováno s různými výsledky více způsobů, kdy některé byly založeny na hydroponii (Hepper 1984, Gryndler et al. 1992) pomocí které lze získat relativně čisté inokulum. Úspěšně byl použit také aeroponický systém, ve kterém jsou kořeny hostitelských rostlin periodicky zavlažovány aerosolem živného roztoku. Nicméně asi nejjednodušším a nejdéle používaným způsobem pěstování AM hub jsou hrnkové kultury. Výhodou pěstování hub v hrnkových kulturách je vyšší stabilita prostředí daná jednak sorpčním komplexem půdy, díky kterému dochází k postupnému uvolňování živin, a také to, že tento systém se nejvíce blíží přírodním podmínkám. Nevýhodou může být přítomnost různých mikroorganismů, které žijí ve volné půdě a v rhizosféře

nebo přímo na kořenech rostlin. Kultivace v *in vivo* podmínkách je náročná zejména na prostor a práci věnovanou údržbě kultur. Pro tento účel se nejlépe hodí minerální porézní a pokud možno inertní substráty o vhodné zrnitosti jako je například zeolit, praný říční písek, keramzit, liapor atd. Jako hostitelské rostliny lze teoreticky použít libovolný druh tvořící AM symbiózu, nicméně je vhodné používat spíše pomaleji rostoucí druhy, jako například jitrocel (*Plantago* sp.), jetel (*Trifolium* sp.), vojtěšku (*Medicago* sp.), aksamitník (*Tagetes* sp.) atd. Výhodné je také použití rostlin s málo pigmentovanými kořeny, ve kterých lze snadno pozorovat AM kolonizaci, jako je např. pórek (*Allium porrum*). Kukuřice (*Zea mays*) není pro svůj rychlý růst příliš výhodná, nicméně v jejích kořenech dochází vlivem kolonizace AM houbami ke tvorbě mykorrhadycinu, což se projeví lokální tvorbou žlutého pigmentu, podle kterého lze rozeznat houbou kolonizované segmenty (Akiyama 2007).

#### **1.4.1. Záchytné kultury**

Získávání spor z půdních vzorků odebraných v polních podmínkách je obtížné a přináší mnoho problémů. Spor může být sice mnoho, ale většina z nich bývá málo životaschopná, navíc často dochází k pozměnění morfologie spor a ke ztrátě charakteristických znaků, nezbytných pro identifikaci. V půdách navíc nalezneme spory pouze těch druhů, které měly dostatek prostoru a energie k vytvoření spor. Tyto problémy lze eliminovat použitím záchytných kultur, jedná se o techniku, při které se odebere v polních podmínkách půda z mykorhizosféry i s kořeny. Tato směs se obvykle míchá s vhodným substrátem, obvykle se sterilním pískem, zeolitem, sterilní půdou apod. Tento krok je vhodný zejména, pokud se snažíme izolovat houby z půd s lepší dostupností živin, jejichž nadbytek by mohl bránit rozvoji AM hub. Kultury se osévají vhodnými hostitelskými rostlinami, s výhodou lze použít rostliny z čeledi Alliaceae např. pórek, česnek, Poaceae např. čirok súdánský, kukuřice setá, trávy jako *Andropogon gerardii*, Plantaginaceae např. jitrocel, Asteraceae např. aksamitník, Fabaceae např. jetel plazivý, tolice, Solanaceae např. tabák virginický, Rosaceae např. mochna husí, jahodník. Kultury se pěstují obvykle po dobu tří až čtyř měsíců, pro sporulaci některých hub je však potřebná doba delší než rok. Kultivaci je vhodné provádět nejlépe v prostorách studeného či vytápěného skleníku v závislosti na druhu použitých hostitelských rostlin. Kultury jsou přihnojovány mírně, zvláště dostupnost

fosforu je kritickým parametrem, který ovlivňuje rozvoj AM hub (Abbott et al. 1984). Na konci kultivace se kultury suší, nejlépe ve stinné místnosti se stabilní teplotou tak, aby doba sušení nebyla příliš rychlá (1–2 týdny). Suché spory AM hub jsou pak z květináče extrahovány metodou mokrého prosévání a tříděny podle morfologie. Tyto spory lze použít pro převod do *in vitro* podmínek, zpravidla však bývá vhodnější jejich pomnožení pasážováním v nových hrnkových kulturách. Tak zpravidla dochází k vyšší sporulaci požadovaných druhů hub, protože je omezena kompetice ze strany jiných druhů AM hub.

### **1.5. Kultivace AM hub v podmínkách *in vitro***

Výhodou kultivace *in vitro* je tvorba mykorhizních kořenů, mycelia a spor bez příměsi bakterií a jiných hub (Declercq et al. 2002) a také možnost vypěstovat velké množství spor AM hub za relativně krátkou dobu na malém prostoru. Pro experimentální práci je také neocenitelná možnost nedestruktivně pozorovat rozvoj hub i kořenů za pomoci preparačního mikroskopu, díky tomu lze kvantifikovat jednotlivé struktury a pozorovat růst mycelia po celou dobu vývoje.

První pokusy o *in vitro* kultivaci AM hub byly učiněny na hostitelských rostlinách jetele, pšenice, okurky a cibule (Mosse 1962) a později na kořenových kulturách (Mosse a Hepper 1975). Dnes se nejčastěji využívají kořeny rostlin geneticky transformovaných Ri–plazmidem z bakterie *Agrobacterium rhizogenes* (Mugnier a Mosse 1987b, Bécard a Fortin 1988, Planchette et al. 1996). Tímto způsobem lze získat kořenové kultury velkého počtu dvouděložných rostlin (Kuzovkina et al. 2004), nicméně pouze některé z nich jsou vhodné jako hostitelé pro kultivaci AM hub. Při výběru hostitelských rostlin nebo kořenových kultur je potřeba brát v úvahu jejich životaschopnost, rychlost růstu, schopnost regenerace, nároky na živiny, ale také pigmentaci kořenů, která může znesnadňovat barvení mykorhiz.

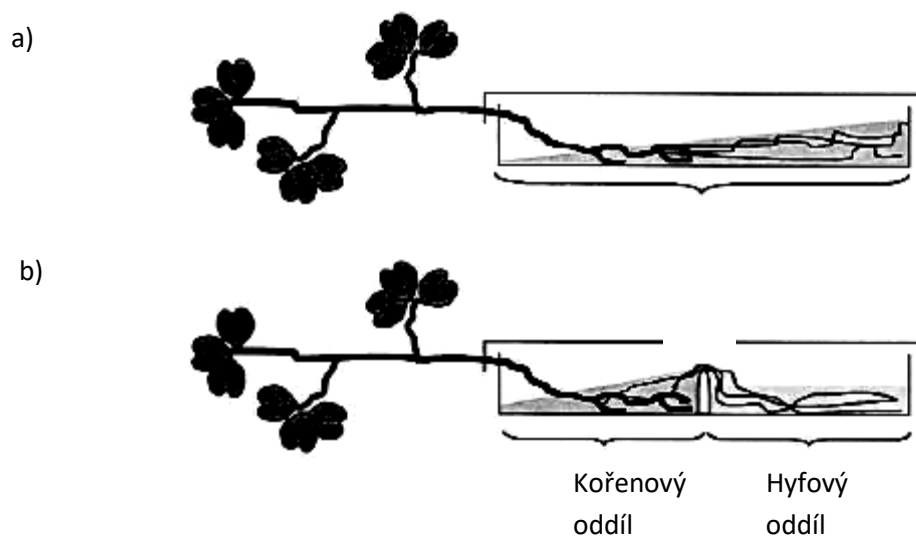
#### **1.5.1. Metody využívající celé rostliny**

Metoda kultivace v polouzavřeném systému spočívá v práci s celou autotrofní rostlinou. Na kultivační médium přenášíme její kořenovou část, kterou uzavřeme do *in vitro* podmínek, zatímco nadzemní část je vyvedena ven otvorem v boku misky. Pro

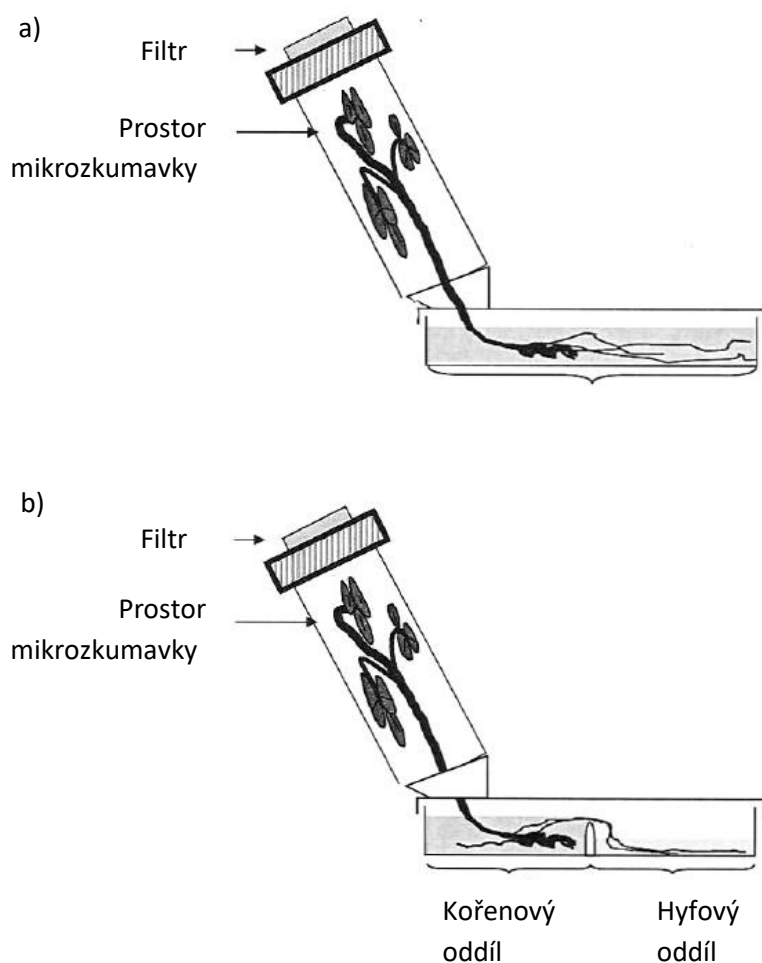
kultivaci lze využít dělené či nedělené Petriho misky (obr. 3. Kultivace na nedělených Petriho miskách, které jsou umístěny pod úhlem  $\pm 4^\circ$ , probíhá na MSR nebo M médiu bez sacharózy a vitaminů. Vytvořený sklon misek zajistí, že výška média nepřesahuje nad otvor v boku misky. Na dělené Petriho misky naléváme MSR médium do obou částí. V části, kde jsou kořeny rostlin, by MSR médium mělo dosáhnout vrcholu dělicí přepážky a na druhé straně být o 2–3 mm níže. Do polouzavřeného kultivačního systému bývají přenášeny vyklíčené semenáčky tolíce (*Medicago*) nebo lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Petriho misky se umísťují do černých neprůsvitných sáčků, aby byly kořeny a AM houby ve tmě. Inkubace těchto kultur probíhá nejlépe v klimatizační komoře. Při této metodě v části rostliny, která je umístěna mimo Petriho misku, dochází k transpiraci, což způsobuje vysychání média, takže je nutná občasná výměna média. Dále mohou otvorem v Petriho misce pronikat různé kontaminace. Výhodou kultivace na dělených Petriho miskách je velké množství spor AM hub vznikajících v hyfovém oddíle. Touto metodou je možné navodit relativně přirozené podmínky růstu rostliny, přirůstání kořenů i nadzemních částí rostliny (Cranenbrouck 2008)

Kultivovat lze i celou rostlinu převedenou do *in vitro* kultivačního systému. Jedná se o metodu dosti podobnou metodě předešlé. V uzávěru odstředivé zkumavky vyřízneme otvor a na něj přilepíme filtr, který zabrání kontaminacím, ale umožní lepší výměnu plynů. Dolní část zkumavky seřízneme na úhel  $\pm 65^\circ$  a následně přilepíme k otvoru v horní části Petriho misky (obr. 4). V nedělených i dělených Petriho miskách probíhá kultivace na MSR nebo M médiu. Kořeny vyklíčené sazenice jsou umístěny na povrch média a horní část je natočena do volného prostoru ve zkumavce. Petriho misku omotáme folií a umístíme do černého neprůsvitného sáčku, aby kořeny byly ve tmě a inkubujeme. Při této metodě celý systém vysychá pomaleji, nicméně je dosti složitý na přípravu a časově náročný. Nevýhodou je obtížná manipulace a omezený prostor pro růst nadzemních částí rostliny.





**Obrázek 3:** Polouzavřený kultivační systém vytvořený a) z nedělené Petriho misky obsahující MSR nebo M médium, které může obsahovat sacharózu a vitamíny. Kořeny rostliny i hyfy mohou prorůstat celým objemem média. Na obrázku b) podobný systém vytvořený z dělené Petriho misky – kořenový oddíl obsahující MSR nebo M médium se sacharózu a vitamíny, hyfový oddíl je bez sacharózy. Do hyfového oddílu mohou prorůstat hyfy, kořeny jsou pravidelně odstraňovány (Cranenbrouck 2008).



**Obrázek 4:** Celé rostliny uzavřené v kultivačním systému vytvořeném a) z nedělené nebo b) dělené Petriho misky. Kořenový oddíl může obsahovat médium MSR nebo M s obsahem sacharózy, nebo bez v závislosti na druhu prováděného experimentu. Hyfový oddíl obsahuje vždy médium bez sacharózy, prorůstá do něj pouze mycelium. Kořeny jsou z něj pravidelně odstraňovány (Cranenbrouck 2008).

### 1.5.2. Transformované hostitelské rostliny

Bakterie rodu *Agrobacterium* jsou parazité rostlin způsobující vznik nádorů hlavně u dvouděložných rostlin. Rostliny jednoděložné jsou proti jejich napadení odolnější a jejich transformace pomocí agrobakterií bývá obtížnější. Při poranění nadzemní či podzemní části rostliny se do půdy uvolňují aminokyseliny, cukry a jiné organické látky, které působí jako atraktanty pro agrobakterie, která pronikají do poraněných pletiv, přilnou k rostlinným buňkám a vnášejí do nich část plazmidu, který

se začleňuje do jaderné DNA hostitelských buněk. Tento přenášený úsek plazmidu je nazýván T-DNA. V případě bakterie *Agrobacterium rhizogenes* se tento plazmid nazývá Ri-plazmid a důsledkem jeho začlenění do rostlinného genomu je intenzivní tvorba tenkých kořenů, zatímco u bakterie *A. tumefaciens* jsou její geny vnášeny do rostlinných pletiv pomocí Ti-plazmidů a výsledkem je vznik nádoru následkem zvýšeného buněčného dělení.

Efektivním způsobem, jak získat kořenové kultury využitelné při kultivaci AM hub, je transformace vhodných hostitelských rostlin pomocí bakterie *A. rhizogenes*. Existuje mnoho protokolů pro Ri T-DNA transformaci rostlin, nicméně pro účely vytvoření kořenové kultury vhodné pro ko-kultivaci s AM houbami lze použít zjednodušený postup a potřebné kroky shrnout do několika fází:

- 1) Příprava rostlinného materiálu.
  - a) Povrchová desinfekce vhodného rostlinného materiálu pro založení explantátové kultury. Pro tento účel jsou vhodná semena, axilární pupeny, listy, kořeny (např. u mrkve).
  - b) Kultivace na vhodném médiu, slouží k namnožení vstupního materiálu pro vlastní transformaci a zároveň při ní lze eliminovat kontaminované explantáty.
  - c) Vlastní příprava explantátu, v tomto kroku odebíráme z kultury vhodné orgány, jako jsou dělohy, pravé listy, stonkové segmenty, hypokotyly nebo kořeny.
- 2) Příprava bakteriální suspenze *A. rhizogenes* spočívá v pomnožení bakterií na vhodném tekutém nebo pevném médiu, v závislosti na zvoleném způsobu transformace. Pokud se jedná o kmeny rezistentní na antibiotika, u nichž rezistence slouží jako selekční marker pro pozdější rozlišení transformovaných a netransformovaných kořenů, pak je zapotřebí přidavek patřičného antibiotika do média.
- 3) Ko-kultivace rostlinného materiálu a kultury *A. rhizogenes*. Rostlinný materiál lze bakteriální suspenzí infikovat různým způsobem, vždy je však vhodné mechanické narušení použitých rostlinných orgánů, které umožní průnik bakterií do rostlinných pletiv.
- 4) Eliminace *A. rhizogenes* z pletiv transformovaných kořenů se provádí na

kultivačních médiích s přidavkem antibiotika, které potlačuje růst zvoleného bakteriálního kmenu. Je potřeba několikanásobné pasážování v krátkých intervalech do doby, než se podaří agrobakteria zcela eliminovat.

- 5) Selekcce transformovaných kořenů je potřebná z důvodu eliminace kořenů, které vznikly důsledkem regenerace, aniž by byl do genomu dané klonální linie začleněn Ri plazmid. Existuje několik způsobů, při kterých lze využít jak reportérové systémy, například GUS ( $\beta$ -glukuronidáza), který byl poprvé izolován z bakterie *Escherichia coli*. Tento enzym se stal nejpoužívanějším reportérovým systémem pro transformace rostlin, protože je termostabilní, toleruje široké rozpětí pH a je citlivý k testování pomocí fluorometrických, spektrofotometrických nebo histochemických metod.  $\beta$ -glukuronidáza je hydrolytický enzym, který štěpí  $\beta$ -glykozidické vazby v  $\beta$ -glukuronidech mezi kyselinou glukuronovou a necukernou složkou (aglykolem). V rostlinách funguje jako spojující gen, kde promotor pocházející z jiného organismu řídí transkripci GUS-kódující sekvence. Vhodná je práce s modifikovaným reportérovým genem pomocí intronu, který bude bránit genové expresi v bakteriích. Nevýhodou tohoto reportérového genu je, že obvykle používané testy zahrnují i zničení rostlinného materiálu. Vystavení rostlinného materiálu substrátu 5-brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronid (X-gluc) nebo substrátu 4-methyl- $\beta$ -umbelliferyl-D-glukuronid (MUG) na krátkou dobu snižuje toxicitu těchto substrátů a umožňuje záchranu rostlinného materiálu. Další možností je použití GFP (green fluorescent protein), což je přirozeně zeleně fluoreskující protein. Byl izolován z mořské medúzy *Aequorea victoria*. V cytoplazmě buněk bioluminiscentních orgánů medúz se nacházejí granulky obsahující fotoprotein aequorin, který se aktivuje pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Původní GFP protein musel být upraven, protože obsahoval sekvenci podobající se rostlinným intronům, což by bylo příčinou vzniku defektního GFP. Tato sekvence byla odstraněna. Výhodou GFP je možnost jeho pozorování v živých tkáních, protože nedochází k destrukci buněk. K jeho pozorování nemusíme přidávat substrát, jak je tomu u GUS reportérového systému. Další možností jak odlišit transformované kořeny od netransformovaných je použití genů pro rezistenci na antibiotika například rifampicin. Tyto geny inkorporované do genomu rostlin umožňují růst kořenů na médiích s přidavkem antibiotika, zatímco růst netransformovaných kořenů je

inhibován.

- 6) Transformované kořeny vytvořené podle tohoto schématu je vhodné otestovat při ko-kultivaci s několika druhy AM hub, vhodné je také jejich porovnání s již ověřenými kořenovými kulturami. Kultura vhodná ke ko-kultivaci s AM houbami musí splňovat několik základních požadavků, zejména mít dostatečnou stabilitu, odolnost, vitalitu a schopnost podporovat růst AM hub.

### 1.5.3. Kultivační média

Na médiích MSR (modifikované Strullu-Romandovo médium) a M (minimální médium) se vytváří mykorhizy jak s netransformovanými kořeny, tak i s kořeny geneticky transformovanými (Declerck et al. 2005). Kultivace kořenových kultur se obvykle provádí na Petriho miskách s pevným médiem, ve tmě při teplotách 20–31 °C. K přípravě pevného média obvykle používáme ztužovala prodávaná pod názvy Phytigel, Gel-Gro, Gelzan. Jedná se o polysacharidy produkované bakterií *Pseudomonas elodea*. Obvyklá dávka těchto ztužovacích látek je 3g/l nebo ekvivalentní množství jiné ztužovací látky, například agaru. Médium ztužené Phytagelem tuhne při teplotě 30 °C. Média MSR a M používaná pro kultivaci AM hub obsahují nižší podíl dusíku a fosforu oproti jiným médiím, jako je např. MS (Murashige-Skoog) médium, jež obsahuje 60,02 mM dusíku a 1,25 mM fosforu. Oproti tomu MSR médium obsahuje jen 0,18 mM dusíku a 0,03 mM fosforu, obsah ostatních prvků je uveden v tabulce 1.




**Tabulka 1:** Složení kultivačních médií M (minimal medium) a MSR (modified Strullu-Romand medium), upraveno podle (Declerck et al. 2005).

Látka	Jednotka	M medium	MSR medium
N(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	(μM)	3 200	3 800
N(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	(μM)	–	180
P	(μM)	30	30
K	(μM)	1 735	1 650
Ca	(μM)	1 200	1 520
Mg	(μM)	3 000	3 000
S	(μM)	3 000	3 013

Cl	( $\mu\text{M}$ )	870	870
Na	( $\mu\text{M}$ )	20	20
Fe	( $\mu\text{M}$ )	20	20
Mn	( $\mu\text{M}$ )	30	11
Zn	( $\mu\text{M}$ )	9	1
B	( $\mu\text{M}$ )	24	30
I	( $\mu\text{M}$ )	4,5	–
Mo	( $\mu\text{M}$ )	0,01	0,22
Cu	( $\mu\text{M}$ )	0,96	0,96
Ca panthotenát	( $\mu\text{M}$ )	–	1,88
Biotin	( $\mu\text{M}$ )	–	0,004
Pyridoxin	( $\mu\text{M}$ )	0,49	4,38
Thiamin	( $\mu\text{M}$ )	0,3	2,96
Kyanokobalamin	( $\mu\text{M}$ )	–	0,29
Kyselina nikotinová	( $\mu\text{M}$ )	4	8,10
Glycin	(mg/l)	3	–
Myo-inositol	(mg/l)	50	–
Sacharóza	(g/l)	10	10
pH	(před sterilizací)	5,5	5,5

#### 1.5.4. Metody izolace AM hub

Pro založení kultur *in vitro* se používají spory, sporokarpy, fragmenty mykorhizních kořenů nebo izolované vezikuly AM hub (Declerck et al. 1998, Strullu a Romand 1986). Princip inokulace spočívá v přenesení povrchově sterilizovaných spor nebo mykorhizních kořenových částí do blízkosti rostoucích kořenů orgánové kultury na vhodném kultivačním médiu. Jedná se o principiálně jednoduché metody, nicméně úspěšnost bývá poměrně nízká, jednak díky obtížné povrchové desinfekci vybraných struktur, ale častým problémem bývá také dormance spor a jejich neochota klíčit v *in vitro* podmínkách.

Druhy AM hub	Typ propagule	Dezinfekce	Předčištění 1	Předčištění 2	Krok 1 ošetření chloraminem T*	Krok 2 ošetření antibiotiky**
Druhy produkující velké spory např. Gigasporaceae – Glomaceae např. <i>Glomus caledonium</i> , <i>G. mosseae</i> atd.	Spora 	Aparatura pro vakuovou filtraci			2-10 min	2-10 min
Druhy produkující sporokarpy např. Glomaceae: <i>Glomus mosseae</i>	Sporokarpy 	Aparatura pro vakuovou filtraci	Ultrazvuk 1 min		2-10 min	2-10 min
Druhy s velkou kořenovou kolonizací a produkcí vezikul: Acaulosporaceae – glomaceae např. <i>Glomus intraradices</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>G. proliferum</i> , atd.	Kořenové fragmenty 	Ultrazvuková lázeň	Ethanol 98 % 10 s	Chlornan vápenatý 6 % 2 min	2-10 min	2-10 min

\* 2 % roztok ( 20 g/l)

\*\* Streptomycin sulfát 0.02% (200 mg/l) a gentamicin sulfát 0.01% (100 mg/l)

**Obrázek 5:** Metody izolace AM hub (upraveno podle Declerck et al. 2005)

### 1.5.5. Ne všechny AM houby umíme kultivovat v podmínkách *in vitro*

Mezi druhy AM hub, které se daří kultivovat na orgánových kulturách kořenů, patří např. *Glomus intraradices*, *Glomus lamellosum* nebo *Glomus claroideum* (tab. 2). Některé další houby lze sice v *in vitro* kulturách udržet po určitou dobu, avšak časem dochází k postupnému snížení životaschopnosti kultury, takovým druhem je například *Glomus versiforme* (Plenchette et al. 1996). Některé druhy AM hub však také dlouhodobě vzdorují snahám o kultivaci v *in vitro* prostředí, mezi tyto druhy patří například zástupci rodu *Scutellospora*.

**Tabulka 2:** Seznam druhů AM hub kultivovaných v podmínkách *in vitro* v nejdůležitějších světových sbírkách těchto organismů.

Webový odkaz	Druh houby	Počet izolátů	
	<i>Glomus mosseae</i> (syn. <i>Funneliformis mosseae</i> )	1	
	<i>Glomus cerebriforme</i>	1	
	<i>Glomus claroideum</i>	2	
	<i>Glomus etunicatum</i>	1	
	<i>Glomus hoi</i>	1	
<a href="http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/collection.php">http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/collection.php</a>	<i>Glomus</i> sp.	1	
	<i>Rhizophagus clarus</i>	1	
	<i>Rhizophagus diaphanum</i>	1	
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	2	
	<i>Rhizophagus irregularis</i>	5	
	<i>Rhizophagus proliferus</i>	1	
	<i>Rhizophagus</i> sp	2	
		<i>Glomus cerebriforme</i>	1
	<a href="http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1236785110466&amp;lang=eng">http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1236785110466&amp;lang=eng</a>	<i>Glomus claroideum</i>	1
<i>Glomus clarum</i>		1	
<i>Glomus irregulare</i>		5	
<i>Glomus proliferum</i>		1	



---

	<i>Glomus</i> sp	2
<hr/>		
	<i>Claroideoglomus claroideum</i>	1
	<i>Gigaspora decipiens</i>	1
	<i>Gigaspora gigantea</i>	1
<a href="http://www.bgiv.com.ar/strains/">http://www.bgiv.com.ar/strains/</a>	<i>Gigaspora rosea</i>	1
	<i>Glomus</i> sp	7
	<i>Rhizophagus clarus</i>	3
	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	5
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	16

---

## 2. Materiál a metody

V praktické části mé bakalářské práce jsem provedla dva pokusy na ověření metod izolace AM hub z kořenových segmentů a povrchové dezinfekce spor. Cílem těchto dvou pokusů bylo ověřit v praxi metody izolace AM hub a získat praktické zkušenosti s prací v *in vitro* podmínkách. Získaný materiál bude využit v mé diplomové práci.

### 2.1. Příprava kultivačních médií

Arbuskulární houby byly izolovány a kultivovány na MSR médiu. Jedná se o médium relativně chudé na živiny, zejména dusík a fosfor. Médium bylo připraveno ze zásobních roztoků (tab. 3). Na 1 litr média bylo odměřeno 10 ml roztoku makroelementů, 10 ml roztoku dusičnanu vápenatého, 5 ml roztoku NaFeEDTA, 1 ml roztoku mikroelementů a 5 ml roztoku vitamínů. Podle potřeby bylo pH média upraveno na hodnotu 5,5 za pomoci 1 mol/l roztoku KOH nebo 1 mol/l roztoku HCl. Sacharóza byla přidána v množství 10 g/l a po jejím rozpuštění Phytigel v množství 3g/l. Sterilizace probíhala v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120 °C. Do misek bylo médium teplé 30 – 40 °C rozléváno v laminárním boxu.

**Tabulka 3:** Zásobní roztoky pro přípravu MSR média. Navážky jsou uvedeny v g/l zásobního roztoku.

#### Makroelementy

KNO <sub>3</sub>	7,60
KCl	6,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,41
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	73,90

#### Dusičnan vápenatý

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	35,90
--	-------

#### Kyselina ethylendiamintetraoctová

NaFeEDTA	1,60
----------	------

Mikroelementy

MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,45
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,28
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,85
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,22
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,034
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0024

Vitamíny

Ca panthotenát	0,18
Biotin	0,00018
Pyridoxin	0,18
Thiamin	0,20
Cyanokobalamin	0,08
Kyselina nikotinová	0,20

**2.2. Pokus 1 – izolace AM hub z kořenových segmentů**

Cílem pokusu bylo ověřit použitelnost izolace AM hub metodou povrchové desinfekce kořenových segmentů pro různé druhy AM hub. Jako výchozí materiál byly zvoleny kultury *Glomus etunicatum* BEG 136 a *Glomus geosporum* Madagaskar. Houby byly kultivovány v podmínkách *in vivo* v asociaci s komonící bílou (*Melilotus albus*). Zdravé kolonizované kořeny byly promyty, zbaveny substrátu a následně protřepány 3× ve sterilní vodě. Takto proprané kořeny byly inkubovány ve 20 ml roztoku antibiotik, obsahujícího streptomycin, polymyxin B, penicillin G a neomycin (každého 500 mg/l) a rolitetracyklin (250 mg/l) po dobu 4 hodin za občasného míchání. Poté byly kořeny řádně promyty sterilní destilovanou vodou a sterilizovány 2 % roztokem Sava po dobu 3 minut. Dále byly kořeny 2× promyty sterilní vodou a nastříhány na 3–5 mm dlouhé segmenty (Hršelová a Gryndler, 2000). Nastříhané kořenové segmenty byly 3× dekantálně promyty sterilní vodou a následně převedeny na Petriho misku, ze které byly tyto nastříhané kořenové segmenty přenášeny na Petriho misky s pevným MSR médiem po 12 kusech. Kultury byly inkubovány po dobu 7 dnů při teplotě 27 °C. Segmenty s proliferujícími hyfami AM hub byly přeneseny na nové MSR médium po jednom segmentu na misku a do jejich blízkosti byly umístěny asi 1 cm dlouhé kořeny

Ri T-DNA transformované čekanky. Po třech měsících kultivace byly kultury pasážovány na dělené misky. Pro tento účel byly použity 94 mm Petriho misky s přepážkou dělicí misku na dva stejné oddíly (Vitrum, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika). Jeden oddíl byl naplněn přibližně 25 ml MSR média, teprve po jeho utužení byl druhý oddíl naplněn 20 ml MSR média bez sacharózy. V miskách by mělo médium dosahovat 1–2 mm pod okraj přepážky. Očkován byl vždy oddíl, který obsahoval sacharózu. Kultury byly inkubovány po dobu 3 měsíců při teplotě 27 °C, poté byly kultury fotograficky zdokumentovány pomocí preparačního mikroskopu s nástavcem na digitální fotoaparát.

### **2.3. Pokus 2 – izolace AM hub metodou povrchové dezinfekce spor**

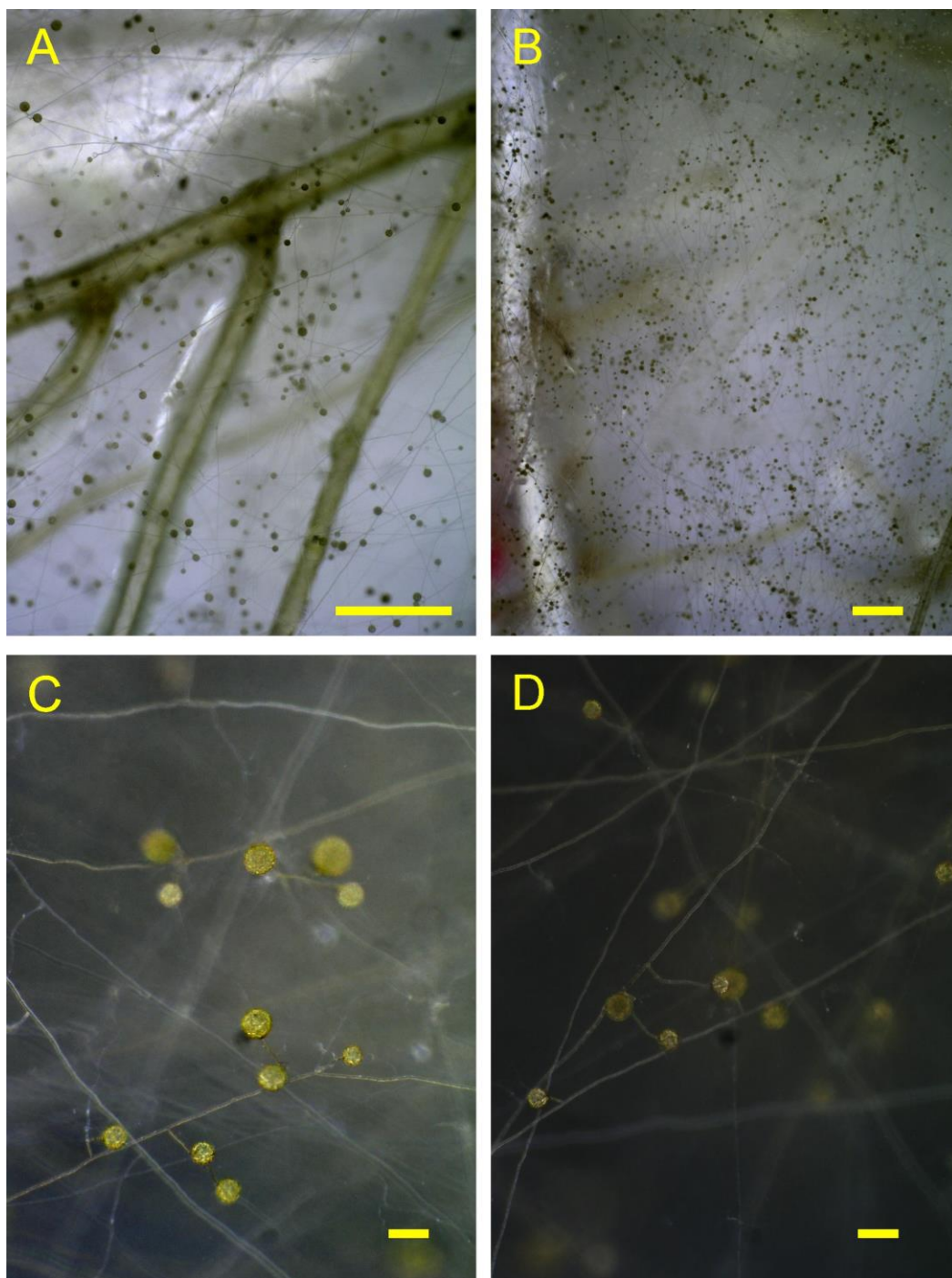
Kulturou použitou pro převod do *in vitro* podmínek byl *Glomus* sp. SAR. S největší pravděpodobností se jedná o druh *Glomus intraradices* nebo *G. irregulare*, které lze bez metod molekulární biologie jen těžko odlišit. Kultura byla pěstována v hrnkové kultuře s kukuřicí setou (*Zea mays*), jetelem plazivým (*Trifolium perens*) a aksamitníkem rozkladitým (*Tagetes patula*) po dobu 5 měsíců v podmínkách studeného skleníku. Jako substrát byl použit přírodní zeolit klinoptilolit. Na konci kultivace bylo inokulum usušeno a skladováno při pokojové teplotě. Pro sběr spor byla použita metoda tzv. mokrého prosévání. Tato metoda spočívá v opakovaném promývání inokula vodou vždy přes 2 síta. Velikost ok horního síta byla zvolena větší, než je velikost spor (250 µm). Spory byly zchyceny na spodním sítu (32 µm, jehož obsah pak byl převeden s čistou vodou na Petriho misku, odkud byly spory pod preparačním mikroskopem vybrány automatickou pipetou. Tento postup byl dle potřeby opakován proto, abychom získali čisté spory bez substrátu a zbytku mycelia. Celkem bylo vybráno 250 spor. V laminárním boxu byly spory převedeny do mikroskopavek a promyty několikrát sterilní vodou a sterilizovány 2% roztokem Sava po dobu 10 minut. Následně byly spory centrifugovány po dobu 20 s při 2 000 RCF. Poté byl automatickou pipetou odebrán supernatant. Spory byly stejným postupem několikrát promyty sterilní vodou. Následně byly spory ošetřeny roztokem antibiotik obsahujícím 10 mg streptomycinu a 5 mg gentamycinu v 50 ml vody. Před použitím byl roztok 2× sterilizován filtrací přes 0,2µm membránový filtr. Spory byly následně i s roztokem antibiotik převedeny na

prázdnou Petriho misku, odkud byly po jedné převáděny na Petriho misky s MSR médiem. Okraje misek byly omotány fólií a po dobu 7 dnů inkubovány při 28 °C. Poté byly kultury zkontrolovány pod preparačním mikroskopem a nekontaminované spory byly přeneseny na nové médium a kultivovány za stejných podmínek po dobu 60 dnů.

### 3. Výsledky

V prvním pokusu, kdy byla testována metodika převodu AM hub do *in vitro* podmínek pomocí povrchové desinfekce kořenových segmentů byla u všech vzorků přibližně jedna třetina segmentů kontaminována saprofytickými houbami, případně kvasinkami a bakteriemi. Z nekontaminovaných segmentů proliferovaly hyfy AM hub u obou vzorků *Glomus etunicatum* BEG 136 a *Glomus geosporum* Madagaskar. Přibližně z 5 % segmentů byly úspěšně získány životaschopné izoláty, které byly přepasážovány na dělené misky na kterých vytvořily velké množství mycelia a spor. Kultury na dělených miskách byly fotograficky zdokumentovány (obr. 6).

Ve druhém pokusu byla přibližně polovina spor kontaminována saprofytickými houbami nebo bakteriemi. U druhé poloviny spor nedošlo ani po 60 dnech k vyklíčení spor. V tomto případě se nepodařilo úspěšně izolovat žádné AM houby.



**Obrázek 6:** Monoxenické kultury AM hub izolovaných z hrnkových kultur *Glomus etunicatum* BEG 136 (A a C) a *Glomus geosporum* Madagascar (B a D). Úsečky představují 1 mm – obrázky A, B a 0,1 mm – obrázky C a D.

## 4. Diskuse

Cílem pokusů bylo ověřit použitelnost dvou odlišných metod pro převod AM hub do *in vitro* podmínek a získat biologický materiál pro další experimenty. Vzhledem k tomu, že v obou pokusech byly použity odlišné druhy hub, nelze na základě těchto výsledků rozhodnout, která z metod je pro převod do *in vitro* podmínek vhodnější.

Část spor *Glomus sp.* SAR která nepodlehla kontaminacím nevyklíčila, což mohlo být způsobeno jejich nízkou životaschopností, nebo poškozením sterilizačním činidlem. V další práci by proto bylo vhodné otestovat více různých desinfekčních činidel a také optimalizovat dobu jejich působení a omezit tak možnost poškození spor. Vzhledem k tomu, že byly spory skladovány při pokojové teplotě, může být příčinou nevyklíčení spor také jejich dormance. V další práci by bylo vhodné vyzkoušet skladování spor při nižších teplotách, (Juge et al. 2002) ať již v suchém stavu, nebo ve vlhku. Další možností by mohl být převod čerstvých spor získaných z aktivně rostoucí hrnkové kultury.

Povrchová desinfekce kořenových segmentů se zdařila u obou testovaných vzorků hub, v obou případech byly získány životaschopné izoláty které dosud aktivně rostou na dělených miskách v asociaci s T- DNA transformovanými kořeny čekanky a jsou pravidelně pasážovány, aniž by u nich došlo k omezení nebo zastavení růstu. Vzhled obou *in vitro* kultur je velmi podobný (obr. 6) a bez molekulární determinace nelze s určitostí říci, zda se jedná skutečně o *Glomus etunicatum* a *Glomus geosporum*, nicméně to nebrání dalšímu využití těchto hub pro experimentální práci již nyní.

Všechny tři použité houby tvoří poměrně malé a zranitelné spory a současně velké množství vnitrokořenového mycelia, vezikulů, případně vnitrokořenových spor, proto lze očekávat vyšší úspěšnost při převodu těchto druhů pomocí kořenových segmentů než spor. Tato hypotéza se potvrdila, nicméně pro vyvození platných závěrů by bylo potřeba většího počtu experimentů a širší druhové spektrum AM hub.



## 5. Literatura

- Abbott L, Robson A, Deboer G. 1984.** The Effect of Phosphorus on the Formation of Hyphae in Soil by the Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Glomus-Fasciculatum*. *New Phytologist* **97**: 437–446.
- Akiyama K. 2007.** Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **71**: 1405–1414.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005.** Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Nature* **435**: 824–827.
- Bidartondo MI, Duckett JG. 2010.** Conservative ecological and evolutionary patterns in liverwort-fungal symbioses. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**: 485–492.
- Bonfante P, Perotto S. 1995.** Tansley-Review No-82 - Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi When Infecting Host Plants. *New Phytologist* **130**: 3–21.
- Cranenbrouck S. 2008.** International training on *in vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi.
- Croll D, Giovannetti M, Koch A, Sbrana C, Ehinger M, Lammers P, Sanders I. 2009.** Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **181**: 924–937.
- Declerck S, Strullu D-G, Fortin JA. 2005.** *In vitro Culture of Mycorrhizas*. Springer.
- Dhillon S. 1993.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas of Equisetum Species in Norway and the Usa - Occurrence and Mycotrophy. *Mycological Research* **97**: 656–660.
- Gryndler M, Baláž M, Hřelová H, Jansa J, Vosátka M. 2004.** *Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin*. Academia.
- Guttenberger M. 2000.** Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta* **211**: 299–304.
- Hřelová H, Gryndler M. 2000.** Effect of spermine on proliferation of hyphae of *Glomus fistulosum*, an arbuscular mycorrhizal fungus, in maize roots. *Folia Microbiologica* **45**: 167–171.
- Juge C, Samson J, Bastien C, Vierheilig H, Coughlan A, Piche Y. 2002.** Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* **12**: 37–42.
- Kuzovkina I, Al'terman I, Karandashov V. 2004.** Genetically transformed plant roots as a model for studying specific metabolism and symbiotic contacts of the root system. *Biology Bulletin* **31**: 255–261.

**Nagahashi G, Douds Jr DD. 2011.** The effects of hydroxy fatty acids on the hyphal branching of germinated spores of AM fungi. *Fungal Biology* **115**: 351–358.

**Plenchette C, Declerck S, Diop TA, Strullu DG. 1996.** Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot root. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 545–548.

**Schussler A. 2000.** *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* **10**: 15–21.

**Staddon PL, Ramsey CB, Ostle N, Ineson P, Fitter AH. 2003.** Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of C-14. *Science* **300**: 1138–1140.

**Stubblefield S, Taylor T, Trappe J. 1987.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany* **74**: 1904–1911.

**Young JPW. 2009.** Kissing cousins: mycorrhizal fungi get together. *New Phytologist* **181**: 751–753.