

UPORABA DVO-FOTONSKEGA KONFOKALNEGA MIKROSKOPA ZA RAZISKOVANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV IN ANALIZA SLIK S PROGRAMOM ImageJ

USE OF TWO-CONFOCAL MYCROSCOPY FOR RESEARCH OF ENZYMATIC ACTIVITY OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND IMAGE ANALYSIS WITH ImageJ PROGRAM

Ines Štraus^{1*}, Marko Kreft² & Hojka Kraigher¹

Delo je prispelo 27. decembra 2016, sprejeto 31. decembra 2016.

Received December 27, 2016; accepted December 31, 2016.

IZVLEČEK

Uporaba dvo-fotonskega konfokalnega mikroskopa za raziskovanje encimske aktivnosti ektomikoriznih gliv in analiza slik s programom ImageJ

Simbioza med ektomikoriznimi glivami in gozdnimi drevesi prispeva k rasti dreves in delovanju ekosistema. Ektomikorizne glive so razvile visoko diferencirane strukture, ki omogočajo različne načine privzemanja hranilnih snovi in transport le teh do korenin. Aktivnost fosfatov v mikoriznih glivah omogoča dostopnost fosfatnih spojin v tleh, do katerih rastline sicer nimajo dostopa. V raziskavi smo analizirali aktivnost na površino hif vezane fosfataze (SBP) mikoriznih gliv pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) in predstavili metodo za zajemanje in analizo slik fosfatne aktivnosti. Uporabili smo dvofotonski konfokalni laserski mikroskop LSM 7 MP, ki omogoča zajemanje slik od površine mikoriznega plašča skozi mikorizni plašč vse do površine koreninskih celic. Koreninske vršičke smo obarvali s komercialnim barvilom ELF[®] 97. Slike smo analizirali s prosto dostopnim programom ImageJ. V članku smo podrobno opisali postopek analize in predstavili prednosti in slabosti izbrane metode.

Ključne besede: na površino vezana fosfataza, eksplozijski tipi, fosfat, ELF[®] 97, bukev

ABSTRACT

Use of two-confocal microscopy for research of enzymatic activity of ectomycorrhizal fungi and image analysis with ImageJ program

The ectomycorrhizal symbiosis of forest trees contributes to the function of ecosystem and tree growth. The symbiotic organs of ectomycorrhiza (ECM) are highly differentiated structures differing in nutrient uptake, transfer capacities and ability to promote tree growth. In the present study surface-bound phosphatase activity (SBP) was analyzed on ectomycorrhiza of beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.). The method for images acquisition and their analysis was discussed. Two-photon confocal laser scanning microscope LSM 7 MP was used to study spatial distribution of SBP enzymatic activity in various thicknesses of ECM mantle in intact (non-sectioned) ECM root tips. ELF[®] 97 was used for staining phosphatase enzymes. Images were analyzed using the freely available program ImageJ. In this article, we describe in detail the analysis procedure and the advantages and disadvantages of the method.

Key words: surface-bound phosphatase, exploration types, phosphate, ELF[®] 97, beech

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, & Inštitut za patofiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia; Celica Biomedical, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana, Slovenia

* ines.straus@gozdis.si

1 UVOD

Encimska aktivnost ektomikoriznih gliv (ECM) in njihovega zunaj koreninskega micelija ima pomembno vlogo pri prenosu hranil iz gozdnih tal in listnega opada do rastline. Encimi, ki jih glive sproščajo v okolico, omogočajo razgradnjo snovi, ki so vezane v tleh in rastlinam nedostopne (KJØLLER & STRUWE 2002). V gozdnih ekosistemih imajo glive ključno vlogo pri obratu, preperevanju in mineralizaciji ogljika, dušika, fosforja in drugih snovi, ki jih pretvorijo v obliko, ki je zopet dostopna rastlinam in drugi talni mikroflori (EKBLAD s sod. 2013, WALLANDER s sod. 2013).

Za opazovanje encimske aktivnosti lahko izbiramo med nedestruktivnimi in destruktivnimi metodami. Nedestruktivne metode temeljijo na opazovanju encimske aktivnosti pri živih celicah. Navadno te metode ne vključujejo barvanja, za opazovanje pa izberemo svetlobni mikroskop (arbuskularna mikoriza), epifluorescenčni mikroskop (avtofluorescenca) (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005) ali konfokalni laserski mikroskop (SCHWEIGER s sod. 2002). Destruktivne metode zajemajo dva tipa barvanj: vitalna barvanja, kjer opazovanje aktivnosti encimov temelji na metabolno aktivnem miceliju gliv in nevitalna barvanja, kjer tehnike barvanja obarvajo tako vitalen kot odmrli mikorizni micelij (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). Nedestruktivne metode so nava-

dno bolj v uporabi pri arbuskularni mikorizi, kjer so korenine neobarvane in ni potrebno predhodno razbarvanje, medtem ko je primarna skorja in plašč ektomikoriznih korenin naravno obarvan, kar zahteva predhodno razbarvanje korenin (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). PRITSCH s sodelavci (2004) so razvili avtomatizirano metodo z mikrotitrskimi ploščami, ki omogoča merjenje encimske aktivnosti fosfataze, hitinaze in β -glukozidaze s spektrofotometrom (oz. čitalcem mikrotitrskih plošč).

V članku bomo predstavili uporabo dvofotonskega konfokalnega laserskega mikroskopa LSM 7 MP, ki omogoča opazovanje debelih preparatov ektomikoriznih korenin, brez predhodne priprave rezin in analizo slik s programom ImageJ ter prednosti oziroma slabosti omenjene metode. Opazovali smo aktivnost na površino vezane fosfomonoesteraze (*angl. surface bound phosphatase* – SBP) pri različnih morfoloških ektomikoriznih gliv. Fosfomonoesteraze so encimi, ki razgrajujejo različne substrate v tleh, kot so inozitol fosfat, polifosfati, mononukleotidi in fosforilirani sladkorji. Glede na optimum pH fosfomonoesteraz ločimo kisle in alkalne fosfataze (CRIQUET s sod. 2004). Aktivnost kisle fosfataze, ki smo jo preučevali, temelji na hidrolizi p-nitrofenil fosfata (pNPP) v p-nitrofenol fosfat (pNP) in fosfat (P) (ALVAREZ s sod. 2004).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Vzorčenje in priprava vzorca za mikroskopiranje

Za mikroskopiranje smo pripravili sveže vzorce mikoriznih kratkih korenin. Vzorčili smo iz rizotronov (Slika 1), lončnih poskusov ali iz narave. Mikorizne kratke korenine smo odrezali s škarjami in jih prenesli v petrijevke z vodo. S korenin smo s pomočjo čopiča odstranili substrat in jih pripravili za barvanje. Za vsak vzorec smo pripravili po tri mikorizne kratke korenine dolžine 3 do 4 mm.

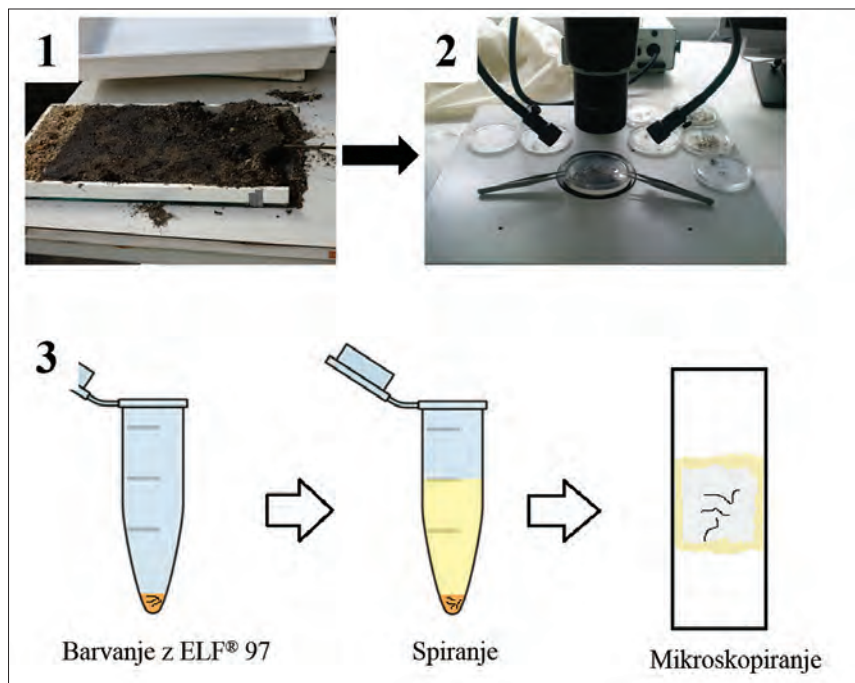
Protokol za pripravo mikoriznih preparatov smo prilagodili po ALVAREZ s sodelavci (2004). Za pripravo preparata smo uporabili fosfatazni substrat ELF[®] 97 (Molecular Probes, Inc., USA) za barvanje in citrat fosfatni pufer za spiranje korenin po barvanju. Citrat fosfatni pufer smo pripravili z mešanjem 3,025 g/l Tris-(hidroksimetil)-aminometana, 2,9 g/l maleinske kisline, 3,5 g/l citronske kisline, 1,57 g/l borove kisline in 1 M NaOH. Pufer smo s pomočjo 1 M HCl umerili na

pH 5. Raztopino ELF[®] 97 smo redčili s citrat fosfatnim puferom v razmerju 10:2 v/v (pufer/ELF[®] 97)

2.2 Barvanje mikoriznih korenin z raztopino ELF[®] 97

Za vsak tip ektomikorize smo barvali po tri kratke korenine (Slika 1). Za analize encimske aktivnosti fosfataze pri glivah (ALVAREZ s sod. 2004) je v uporabi komercialni kit ELF[®] 97 (JOHNSON & SPENCE 2010). Kit vsebuje topni substrat, ki ob prisotnosti delovanja fosfataze fluorescira. Prednost ELF[®] 97 je ta, da je razlika med vrhovoma ekscitacijske in emisijske valovne dolžine približno 200 nm, kar omogoča, da lahko signal, ki nastane kot posledica delovanja encimov, jasno ločimo od signala, ki nastane kot posledica avtofluorescence mikoriznega micelija (JOHNSON & SPENCE 2010).

Očiščene mikorizne korenine smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in dodali 44 μ l raztopine ELF[®]



Slika 1: 1-vzorčenje ECM korenin iz rizotrona; 2-priprava ECM korenin za barvanje; 3-barvanje ECM korenin z ELF® 97 za 15 minut, spiranje s citrat fosfatnim pufrom, da zaustavimo encimatsko reakcijo in prenos obarvanih koreninskih vršičkov na objektno stekelce, kjer smo jih pokrili s krovnim stekelcem in zalepili z voskom

Figure 1: 1-ECM roots tips were sampled from rhizotron; 2- ECM roots tips were prepared for staining; 3-ECM root tips were stained using ELF® 97 staining, after 15 minutes incubation they were rinsed with citrate-phosphate buffer solution in order to stop the enzymatic reaction and transferred to object slides and sealed with cover slides and wax

97 (pH=5), 5x redčitev. Korenine smo barvali 15 minut, nato smo jih previdno prenesli v nove 1,5 µl mikrocen-trifugirke, ter jih sprali s 100 µl citrat fosfatnega pufra (pH=5). Obarvane mikorizne korenine smo po spiranju prenesli na objektna stekelca s pufrom, na katera smo v obliki kroga nakapljali stopljen vosek v debelini mikoriznih korenin. Na korenine smo položili krovna stekelca in jih dodatno zalepili s stopljenim voskom vzdolž robov.

2.3 Mikroskopiranje

Mikroskopiranje smo izvajali na Inštitutu za patofiziologijo v Ljubljani, v Laboratoriju za neuroendokrinologijo in molekularno celično fiziologijo (referenčni center za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss). Za mikroskopiranje smo uporabili dvofotonski konfokalni mikroskop LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija), ki je bil nameščen v zatemnjenem prostoru na protivibracijski mizi, saj lahko mehanski tresljaji in svetloba motijo meritve. Slike za analize (serija optičnih rezin po z-osi; ang.: Z-

-stack) smo zajemali s programsko opremo ZEN 2012 (black edition, Release version 8.0, © Carl Zeiss Microscopy GmbH 1997-2013). Razmik med rezinami je bil 10 µm. Za vsak vzorec smo opravili tri ponovitve meritev na treh različnih lokacijah na korenini.

2.4 Dvofotonski konfokalni laserski mikroskop

Za razliko od elektronske mikroskopije (STEMPAK & WARD 1964), ki je sicer tudi zelo razširjena metoda, omogoča fluorescenčna mikroskopija opazovanje živih celic in procesov, ki potekajo v njih (HEINTZMANN & FICZ 2006, LIPPINCOTT-SCHWARTZ & PATTERSON 2003). Fluorescenca je pojav, pri katerem lahko s svetlobo primerne valovne dolžine molekulo vzbudimo v višje energetske stanje, nato pa vzbujena molekula izseva foton in preide nazaj v osnovno energetske stanje (HELL & WICHMANN 1994). Osnova konfokalnega mikroskopa je fluorescenčni mikroskop (HEINTZMANN & FICZ 2006). Konfokalni mikroskop ne osvetljuje celotnega vzorca hkrati, temveč ga z laser-

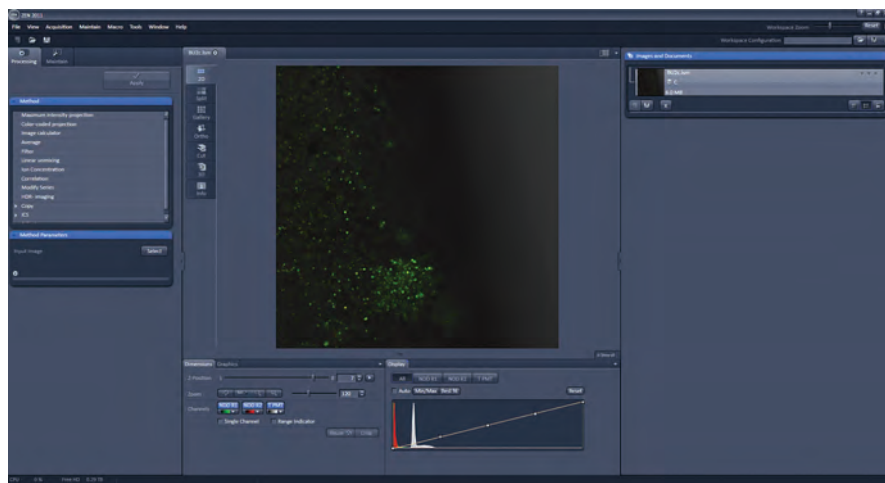
skim žarkom pregledujemo v določeni optični ravnini (HEINTZMANN & FICZ 2006). Vzbujeno fluorescentno svetlobo iz točk sprejme detektor, ki informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Običajni enofotonski konfokalni mikroskop ima vgrajeno zaslonko, ki preprečuje pot svetlobe iz ozadja vzorca do detektorja (FÖLDES-PAPP, DEMEL & TILZ 2003, WILHELM s sod. 2014). Dvofotonski konfokalni mikroskop vzbuja molekule z dvema fotonoma daljše valovne dolžine (DENK s sod. 1990). Molekula mora sočasno absorbirati dva fotona, da preide v višje energetske stanje, kar zagotovimo z veliko gostoto fotonov, oziroma z zelo veliko intenziteto svetlobe (DENK s sod. 1990, HELMCHEN & DENK 2005), kar dosežemo z zbiranjem žarkov v gori-

šču in s pulznim delovanjem laserja. Posledično je intenziteta svetlobe dovolj velika, da pride do vzbujanja fotonov le v gorišču, hkrati pa se izognemo moteči svetlobi iz ozadja vzorca (DENK s sod. 1994). Ker pri dvofotonskem mikroskopu vzbujamo fotone z dvakrat daljšo valovno dolžino, je v primerjavi z navadnim konfokalnim mikroskopom tudi ločljivost slike posledično nekoliko manjša, medtem ko je sipanje fotonov manjše. Zato izbiro mikroskopa prilagodimo vzorcu: če je vzorec debel in se svetloba fotonov močno siplje, izberemo dvofotonski konfokalni mikroskop, v nasprotnem primeru pa enofotonski konfokalni mikroskop (DENK s sod. 1994). Za naše raziskave smo uporabili dvofotonski laserski mikroskop.

3 ANALIZA SLIK S PROGRAMOM ImageJ 1.46R

Slike smo analizirali s programom ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA). Za analizo smo slike najprej izvozili iz programa ZEN 2011 (Slika 2) in jih

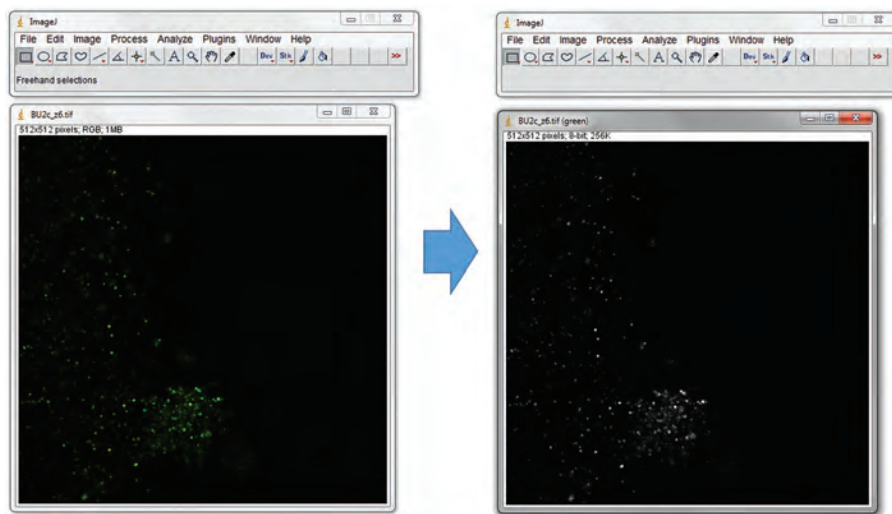
shranili v formatu .tif. Pri slikah smo pred izvažanjem izklopili kanal z belo svetlobo, ker je sicer le-ta motil nadaljnje analize.



Slika 2: Izvoz slike iz programa ZEN 2011 v formatu .tif za nadaljnje analize
Figure 2: Image export from ZEN 2011 in .tif format for further analysis

Nato smo sliko odprli v programu ImageJ 1.46r, jo razdelili na kanale (*Split channels*) in zaprli vse razen

zelenega kanala (Slika 3). Iz originalne slike smo naredili dvojnik, na katerih smo nadaljevali z analizami.

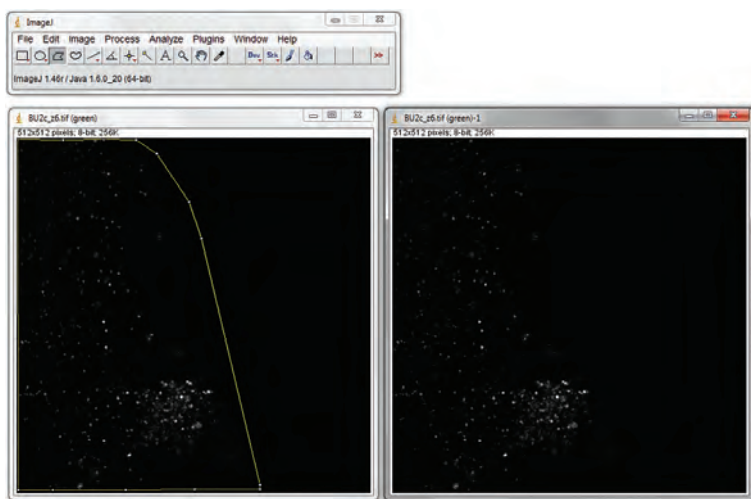


Slika 3: Slika originala preden smo jo razdelili na kanale (levo) in slika z izbranim zelenim kanalom pripravljena za nadaljnje analize (desno)

Figure 3: Original image before separating on channels (left) and selected green channel image of the same picture ready for analyses (right)

3.1 Analiza originala:

S funkcijo *Polygon Selections* smo označili celotno površino mikorizne korenine oziroma hife, ki smo jo želeli analizirati (Slika 4).

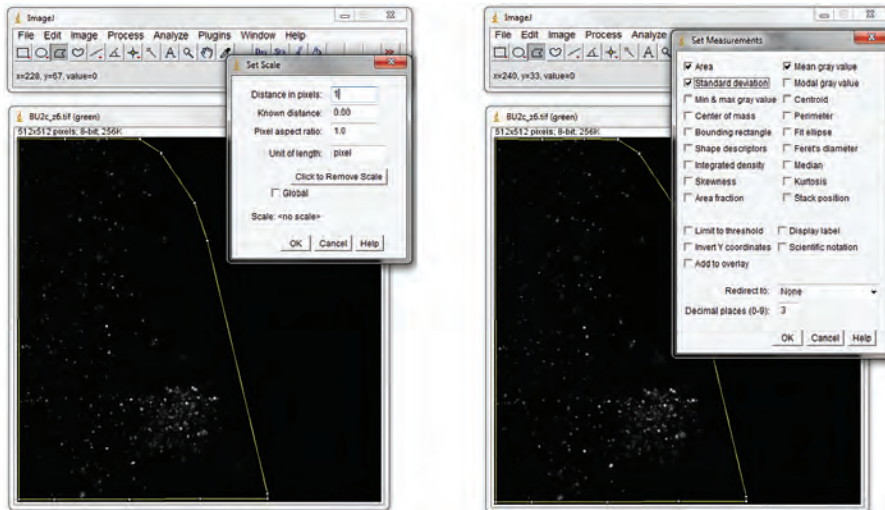


Slika 4: Označevanje površine, kjer se pojavljajo aktivni encimi SBP na mikoriznem plašču z orodjem *Polygon selections*

Figure 4: Marking areas where active enzymes SBP were present on mycorrhizal mantle surface using tool *Polygon Selections*

Nato smo nadaljevali z nastavitvami: *Analyze* → *Set Scale...*, kjer smo pri prvi postavki *Distance in Pixels* vpisali 1 in tako določili velikost točkovne enote. Pri nastavitvah (*Set Measurements*) smo za izbrana parametra izbrali površino označene površine (*Area*) in

povprečno intenziteto fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*). Podatek *Mean gray value* ima smisel le v sivi sliki preden določimo prag. Pri analizi originala odključamo opcijo omejitev na prag (*Limit to Threshold*) (Slika 5).

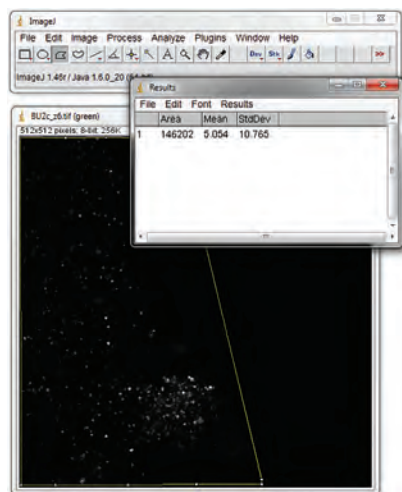


Slika 5: Določevanje velikosti točkovne enote (piksel) (levo) in izbor zelenih parametrov za analize, v našem primeru površina označene površine (*Area*) in povprečna intenziteta fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*) (desno). Pri nastavitvah za analize originala odključamo funkcijo omejitve na nadprazno vrednost.

Figure 5: Determination of the size of the pixel unit (left) and selection of the parameters for the analysis in this case the area of the selected surface (*Area*) and the average intensity of fluorescence (*Mean gray value*) (right). In window *Set Measurements* for analyses of the original image tick off option *Limit to threshold*.

Ko smo nastavili parametre, smo nadaljevali z meritvami: *Analyze* → *Measure*. Pojavilo se je okno z meritvami (Slika 6), ki smo jih prepisali v tabelo v MS

Excel, ki smo jo pripravili sami. Prepisali smo podatke za površino (*Area*) in povprečno intenziteto fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*).



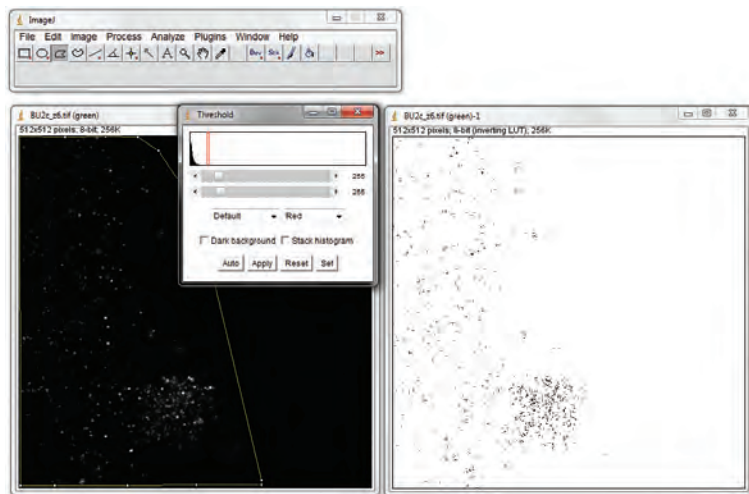
Slika 6: Okno z meritvami, ki jih prepisemo v tabelo MS Excel za nadaljnje analize. Figure 6: Window with results of measurements, that should be copied in MS Excel table for further analyses.

Po analizi originala smo nadaljevali z analizo na dvojnikih, kjer smo merili vrednosti pri pragu 10 %.

3.2 Analiza dvojnika

Preden smo začeli z analizo, smo postavili prag: *Image* → *Adjust* → *Threshold...* (Slika 7). V odprtem

oknu se pojavi graf in dva drsnika. Za analize premikamo le zgornji drsni, ki na nastavimo na želeno nadprazno vrednost vseh dimenzij, pri čemer upoštevamo da je slika 8-bitna. Za prag 10 % nastavimo drsni na 25. Nastavitev potrdimo s klikom na gumb *Apply*.



Slika 7: Nastavitev zelene nadprazne vrednosti za analize.
Figure 7: Setting of threshold value for analyses.

Nato smo kopirali označeno površino iz originalne slike na dvojnik: *CTRL+C* → *Edit* → *Selection* → *Restore Selection*

Sledile so nastavitve za analize: *Analyze* → *Set*

Scale... → *Distance in Pixels = 1, Set Measurements...*, kjer smo odkljukali *Limit to Threshold*

Pri opravljenih meritvah smo prepisali le vrednost za površino (*Area*): *Analyze* → *Measure...*

4 RAZPRAVA

Encimsko aktivnost lahko ugotavljamo s pomočjo barvil, ki temeljijo na fluorescenci. Za ta namen so v uporabi komercialno dostopni kiti (JOHNSON & SPENCE 2010). Za analize encimske aktivnosti fosfataze pri glivah (ALVAREZ s sod. 2004, 2012) je v uporabi komercialni kit ELF[®] 97 (JOHNSON & SPENCE 2010). Kit vsebuje topni substrat, ki ob prisotnosti delovanja fosfataze proizvede fotostabilen rumeno-zelen precipitat na strani aktivnega encima. Prednost ELF[®] 97 je ta, da je razlika med vrhovoma ekscitacijske in emisijske valovne dolžine približno 180 nm, kar omogoča, da lahko signal, ki nastane kot posledica delovanja encimov, jasno ločimo od signala, ki nastane kot posledica avtofluorescence mikoriznega micelija (JOHNSON & SPENCE

2010). Substrat se lahko uporablja za opazovanje živih celic, vendar nima možnosti prehajanja skozi celično steno, zato lahko opazujemo le aktivnost na površino vezanih encimov. Avtorji (JOHNSON & SPENCE 2010) protokolov navajajo, da intenziteta fluorescentnega signala fiksniranih preparatov ostaja bolj ali manj enaka več mesecev ali celo let, kar potrjujejo tudi naše izkušnje. VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT (2005) uvrščajo ELF[®] 97 med vitalna barvila, saj ni potrebno predhodno razbarvanje korenin. V naših raziskavah smo opazili, da barvilo prosto prehaja do mikoriznega plašča, kjer koreninski vršiček ni obdan z gostimi izhajajočimi elementi, kot so hife, oziroma kadar je korenina svetlih barv. V primeru, ko je preplet hif okrog ko-

reninskega vršička gost, smo opazili, da je preparat slabše obarvan ali je obarvan le na površini in barvilo ni prodrlo v notranjost. Za temno obarvane koreninske vršičke pa ne moremo zagotovo trditi, ali je nizek delež opaženih encimov posledica slabšega prodiranja barvila v notranjost, ali je to posledica temno obarvanega preparata, ki onemogoča prehod emisijske svetlobe. Pri uporabi ELF® 97 moramo biti pozorni na biotske (število bakterij in gliv, koncentracija proteinov) in abiotske dejavnike (pH, temperatura, vlaga), ki lahko vplivajo na aktivnost encima in s tem na rezultate. Vpliv pH na aktivnost fosfataze je vrstno specifičen (ALVAREZ s sod. 2004; BAGHEL, SHARMA & PANDEY 2009). BAGHEL, SHARMA & PANDEY (2009) so pri glivi *Cantharellus tropicalis* dokazali višjo aktivnost SBP pri 40 °C in značilno nižjo aktivnost pri 35 °C. Korelacijo med kislom fosfatazo in temperaturo ter vlago so opazili tudi CRIQUET s sodelavci (2004) v listnem opadu. ALVAREZ s sodelavci (2012) so preučevali vpliv morfotipov (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Descolea antarctica*) in vnos hranilnih snovi (angl. *soil fertility*) v tla na aktivnost kisle fosfataze. Ugotovili so, da na prostorsko razporeditev kisle fosfataze v mikoriznem miceliju vpliva morfotip (zunaj koreninski micelij, mikorizni plašč in Hartigova mreža), medtem ko vnos snovi v tla vpliva na encimsko aktivnost zunaj koreninskega micelija in Hartigove mreže.

Dvofotonski konfokalni mikroskop omogoča opazovanje vitalnih preparatov, poleg tega pa z njim lahko opazujemo debelejšje preparate oziroma kar cele koreninske vršičke, saj lahko optično prodremo skozi mikorizni plašč vse do celic korenine in zato predhodna priprava rezin ni potrebna. Tako prihranimo na času, poleg tega pa opazujemo nepoškodovan koreninski vršiček v celoti, razen v že prej omenjenem primeru temno obarvanih mikoriznih gliv, kjer bi morali kore-

nine predhodno očistiti oziroma razbarvati (SCHWEIGER s sod. 2002, VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). Za encimske analize so v uporabi tudi encimski testi na filter ploščah (PRITSCH s sod. 2011), ki omogočajo analize različnih encimov hkrati, vendar imamo v tem primeru le podatek o jakosti fluorescenčnega signala, nimamo pa podatka o razporejanju encimov v mikoriznem miceliju.

Za analize slik smo izbrali prosto dostopen program ImageJ 1.46j, ki je v znanosti uporabljen že več kot 25 let, še posebej se je razširil med uporabniki za analize slik s področja biologije (SCHNEIDER, RASBAND & ELICEIRI 2012). ImageJ 1.46r v našem primeru na sliki originala izmeri površino, ki jo zasede vzorec. Rezultati analize predstavljajo povprečne intenzitete fluorescence teh površin za vsak vzorec. Pri tem je potrebno opozoriti, da ima analiza intenzitete fluorescence na originalni sliki smisel le, kadar so vsi pogoji med vzporedno posnetimi slikami enaki (enako barvanje, enaka moč laserja, fotopomnoževalke in drugo). Zagotavljanje enakih pogojev je skoraj nemogoče, zato smo za analize izbrali kontrastne slike, kar pomeni merjenje površine pri določenem pragu. To nam omogoča tudi ponovljivost metode in primerjanje podatkov. Preden se odločimo, kateri prag bomo izbrali, naredimo vzporedne analize slik pri različnih nadpraznih vrednostih in izberemo tisto nadprazno vrednost, ki najbolj ustrezno odstrani vsa nespecifična barvanja. Pri delu s programom ImageJ 1.46r smo opazili, da je enostaven za uporabo, da preprosto označimo površino, ki jo želimo analizirati in da so meritve zelo natančne. Slabosti metode, ki smo jih med uporabo opazili, so, da (1) je v primeru, ko je odprtih več oken (original in dvojnik), potrebno vedno znova označiti na katero okno se nanaša ukaz oziroma meritev, (2) funkcija razveljavi (*Undo*) sicer deluje, ampak naslednja meritev ni več zanesljivo pravilna.

5 ZAKLJUČKI

Metoda, ki smo jo predstavili, je nova in edinstvena predvsem zaradi uporabe dvofotonskega laserskega mikroskopa. Omogoča opazovanje encimske aktivnosti fosfataze in njeno razporejanje v mikoriznem miceliju brez uporabe rezin. Konfokalna mikroskopija je že bila uporabljena za opazovanje aktivnosti SBP pri

ECM glivah (ALVAREZ s sod. 2004, 2012), vendar vedno na pripravljenih rezinah ECM korenin, ki omogoča ozek vpogled v zelo majhen del korenine. V prihodnje želimo metodo še razviti in raziskati, ali je razporejanje encimov pri različnih eksploracijskih tipih povezano z njihovo funkcijo v naravi.

6 SUMMARY

Enzymatic activity could be detected by dyes based on fluorescence. For this purpose, the commercially available kits are applicable (JOHNSON & SPENCE 2010). ALVAREZ et al. (2004, 2012) used commercial kit ELF[®] 97 for analyses of surface-bound phosphatase activity. ELF[®] 97 contains a soluble ELF substrate, which forms an intense yellow-green-fluorescent alcohol precipitate at the site of phosphatase activity. ELF[®] 97 alcohol precipitate is separated from its excitation maximum by over 180 nm, so ELF 97 signal can be clearly distinguished from most cell and mycorrhizal mycelium autofluorescence (JOHNSON & SPENCE 2010). Substrate can be used for observing life cells, but it can not pass the cell wall, so just surface bound enzymatic activity can be analyzed. The authors of protocols indicate, that ELF 97 phosphate-based staining of fixed samples can persist for a month to one year with little if any loss of signal, and this was noticed also in our experiments. VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT (2005) classified ELF 97 into vital staining techniques, because clearing of roots is not necessary. In our research, we noticed that the dye passes freely to the mycorrhizal sheath, if the root tips are not surrounded by dense emanating elements such as hyphae, or if the roots are of light colors. In the cases in which hyphae around the root tips are dense, we observed that the mycorrhizal structures are less colored or are colored only on the surface, indicating the dye has not penetrated in the interior. For dark colored root tips we cannot definitely claim whether a low percentage of the observed enzyme results from lower dye penetration into the interior or whether this is due to the dark-colored mycorrhizal mantle that prevents the emission light passing through. When using ELF[®] 97 care must be taken on biotic (the number of bacteria and fungi, protein concentration) and abiotic factors (pH, temperature, humidity), which can affect the enzyme activity and thus also the results. The influence of pH on the phosphatase activity is species dependent (ALVAREZ et al. 2004, BAGHEL, SHARMA & PANDEY 2009). BAGHEL, SHARMA & PANDEY (2009), demonstrated higher activity of SBP at 40 ° C and typically a lower activity at 35 ° C for the fungus *Cantharellus tropicalis*. The correlation between the acid phosphatase, and the temperature and humidity were also observed by CRIQUET et al. (2004) in the leaf litter. ALVAREZ et al. (2012) studied the influence of morphotypes (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Descolea Antartica*) and soil fertility on acid phosphatase activity. They found

that spatial distribution of acid phosphatase in mycorrhizal mycelium is affected by mycorrhizal morphotype (extraradical mycelium, mycorrhizal mantle and Hartig net), while soil fertility had a significant effect on the enzymatic activity in the extraradical mycelium and Hartig net.

Two-photon confocal microscope allows observation of vital mycorrhizal fungi, in addition prepared samples can be thick, or even whole root tips can be observed, because the laser beam can penetrate through mycorrhizal mycelium layers to the root cells, therefore, the prior preparation of the t mycelium slices is not necessary. The advantage of this microscope is in its time-efficiency and the possibility to observe intact root tips, except for the before mentioned case of dark colored mycorrhizal fungi, which should be cleared before staining (SCHWEIGER et al. 2002, VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). For analysis of enzymatic activity enzyme assays on the filter plates are also in use (PRITSCH et al. 2011), which enable the analysis of several enzymes at the same time, however, this tests give only information of the intensity of the fluorescent signal, but no information about the allocation of enzymes in mycorrhizal mycelium.

For image analysis we have selected the freely available program ImageJ 1.46j, which is used in science for more than 25 years, particularly for image analysis in biology (SCHNEIDER, RASBAND & ELICEIRI 2012). In our case, ImageJ measures the area covered by the sample in the original image. Results of analyzes represent the average intensity of the measured areas for each sample. It is important to notice, that analyzes of intensity on original images are suitable if all conditions between compared images are the same (the same staining, the same power of laser, photomultiplier...). More reproducible and also simpler is to analyze the copies representing contrasted images, measuring the area above the threshold value. It is important to choose the threshold that most effectively cuts off all non-specific staining. When working with the program ImageJ 1.46r we noticed that it is a simple and intuitive program to use, that has high accuracy of selection and it is simple to select the measuring area. Disadvantages of ImageJ were (1) a click on every image, and for each step, is needed if more images are open (original and duplicates), (2) caution in the work order is necessary, since if the operator uses the *Undo* function it can result in wrong measurements.

7 CONCLUSIONS

The method used in our study is novel because of use of two-photon confocal microscopy. It allows to study spatial distribution of SBP enzymatic activity in various thicknesses of ECM mantle in intact (non-sectioned) ECM root tips. Although confocal microscopy for observation of SBP activity in ECM was already used be-

fore (ALVAREZ et al. 2004, 2012), it was used only in sectioned ECM roots, that allowed an insight into a very small fraction of the ECM root. We suggest that two-photon confocal microscopy could prove useful in future to study distribution of enzymatic activity of different exploration types and their function in nature.

ZAHVALA - ACKNOWLEDGEMENTS

Predstavljena metoda je bila razvita v okviru doktorske naloge mlade raziskovalke (IŠ), in je bila financirana iz ARRS v okviru programske skupine P4-0107, Ministrstva za Kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano v okviru projektov L4-2265 in L4-4318 in projektu EU-

FORINNO (RegPot No. 315982). Zahvaljujemo se tudi podjetju Celica d.o.o. in Inštitutu za patofiziologijo Medicinske univerze v Ljubljani, ki sta omogočila delo na dvo-fotonskem konfokalnem mikroskopu.

8 LITERATURA – REFERENCES

- ALVAREZ, M., R. GODOY, W. HEYSER & S. HÄRTEL, 2004: *Surface-bound phosphatase activity in living hyphae of ectomycorrhizal fungi of Nothofagus obliqua*. Mycologia (Lawrence) 96 (3): 479-487.
- ALVAREZ, M., D. HUYGENS, L. M. DÍAZ, C. A. VILLANUEVA, W. HEYSER & P. BOECKX, 2012: *The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake*. Plant, Cell & Environment (New Jersey) 35 (1): 126-135.
- BAGHEL, R. K., R. SHARMA & A. K. PANDEY, 2009: *Activity of acid phosphatase in the ectomycorrhizal fungus Cantharellus tropicalis under controlled conditions*. Journal of Tropical Forest Science (Ithaka) 21 (3): 218-222.
- CRICQUET, S., E. FERRE, A. M. FARNET & J. LE PETIT, 2004: Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. Soil Biology and Biochemistry (Amsterdam) 36 (7): 1111-1118.
- DENK W., STRICKLER, J. H., WEBB, W. W. 1990. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science (New York), 248, 4951: 73-76.
- DENK, W., K. R. DELANEY, A. GELPERIN, D. KLEINFELD, B. W. STROWBRIDGE, D.W. TANK & R. YUSTE, 1994: *Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy*. Journal of Neuroscience Methods (Amsterdam) 54 (2): 151-162.
- EKBLAD, A., H. WALLANDER, D. L. GODBOLD, C. CRUZ, D. JOHNSON, P. BALDRIJAN, R. G. BJÖRK, D. EPRON, B. KIELISZEWSKA-ROKICKA, R. KJØLLER, H. KRAIGHER, E. MATZNER, J. NEUMANN & C. PLASSARD, 2013: *The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling*. Plant and Soil (Dordrecht) 366 (1-2): 1-27.
- FÖLDES-PAPP, Z., U. DEMEL & G. P. TILZ, 2003: *Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview*. International Immunopharmacology (Amsterdam) 3 (13-14): 1715-1729.
- HEINTZMANN, R. & G. FICZ, 2006: *Breaking the resolution limit in light microscopy*. Briefings in Functional Genomics & Proteomics (Oxford) 5 (4): 289-301.
- HELL, S. W. & J. WICHMANN, 1994: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Optics Letters (Washington) 19 (11): 780-782.
- HELMCHEN, F. & W. DENK, 2005: *Deep tissue two-photon microscopy*. Nature Methods (New York) 2 (12): 932-940.
- JOHNSON, J. & M. T. Z. SPENCE, 2010: *Phosphatase-Based Signal Amplification Techniques. V: The Molecular Probes® Handbook. A guide to fluorescence probes and labeling technologies*. 11th edition. Life Technologies Corporation (Waltham): pp. 203-211.
- KJØLLER, A. H. & S. STRUWE, 2002: *Fungal communities, succession, enzymes and decomposition*. V: Bruns, R. G. & R. P. Dick R.P., (ur.): *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. CRC Press (New York), pp. 267-285.

- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & G. H. PATTERSON, 2003: *Development and use of fluorescent protein markers in living cells*. Science (Washington) 300 (5616): 87-91.
- PRITSCH, K., S. RAIDL, E. MARKSTEINER, H. BLASCHE, R. AGERER, M. SCHLOTER & A. HARTMANN, 2004: *A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbellifere-labelled fluorogenic substrates in a microplate system*. Journal of Microbiological Methods (Amsterdam) 58 (2): 233-241.
- PRITSCH, K., P. COURTY, J.-L. CHURIN, B. CLOUTIER-HURTEAU, M. ALI, C. DAMON, M. DUCHEMIN, S. EGLI, J. ERNST, T. FRAISSINET-TACHET, F. KUCHAR, E. LEGNAME, R. MARMEISSE, A. MÜLLER, P. NIKOLOVA, M. PETER, C. PLASSARD, F. RICHARD, M. SCHLOTER, M.-A. SELOSSE, A. FRANC & J. GARBAYE, 2011: *Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae*. Mycorrhiza (Berlin) 21 (7): 589-600.
- SCHNEIDER, C. A., W. S. RASBAND & K. W. ELICEIRI, 2012: *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods (New York) 9: 671-675.
- SCHWEIGER, P. F., H. ROUHIER & B. SÖDERSTRÖM, 2002: *Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy*. Mycological Research (Manchester) 106 (3): 349-354.
- STEMPAK, J. G. & R. T. WARD, 1964: *An improved staining for electron microscopy*. The Journal of Cell Biology (New York) 22 (3): 697-701.
- VIERHEILIG, H., P. SCHWEIGER & M. BRUNDRETT, 2005: *An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots*. Physiologia Plantarum (Chichester) 125 (4): 393-404.
- WALLANDER, H., A. EKBLAD, D. L. GODBOLD, D. JOHNSON, A. BAHR, P. BALDRIJAN, R. G. BJÖRK, B. KIELISZEWSKA-ROKICKA, R. KJØLLER, H. KRAIGHER, C. PLASSARD & M. RUDAWSKA, 2013: *Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – A review*. Soil Biology and Biochemistry (Amsterdam) 57: 1034-1047.
- WILHELM, S., B. GROBLER, M. GLUCH & H. HEINZ, 2014: *Confocal laser scanning microscopy principles*. Microscopy from Carl Zeiss. Zeiss. (Jena): 1-30.