

Onderzoek naar de afbraak van organisch materiaal door Fungi in heidegebied

Sofie Croes

Master IW biochemie

Inleiding

Struikhei of *Calluna vulgaris* behoort tot de orde Ericales en de familie Ericaceae [1]. Leden van de plantenfamilie vormen een uniek type mycorrhizasymbiose met schimmels, namelijk de ericoïde mycorrhiza. Planten die dit type mycorrhiza ontwikkelen, zoals *C. vulgaris*, worden gekenmerkt door speciale zijwortels, ook wel haarwortels genoemd. De schimmeldraden dringen de epidermale celwand van de haarwortel binnen om vervolgens de epidermale cellen te koloniseren en hierbij hyfencomplexen te vormen binnen elke cel (Figuur 1) [1].

Een infectie door de ericoïde mycorrhizaschimmel in de heideplant maakt het mogelijk stikstof (N) te verkrijgen van een aantal verschillende bronnen, in ruil daarvoor krijgt de schimmel suikers [1]. In het licht van de klimaatverandering waarbij heide gaat verdwijnen door competitie met grassen, is het nuttig de mechanismen te onderzoeken die N in de bodem verwerken. Hierin spelen de ericoïde mycorrhizaschimmels een grote rol. Deze produceren enzymen die N-bevattende organische verbindingen degraderen.



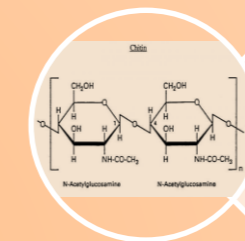
Figuur 1: Voorbeeld van gevormde hyfencomplexen in een epidermale cel

Doelstellingen

Het doel van deze masterproef is om bij te dragen aan het onderzoek naar de N-cyclus in het heide-ecosysteem onder het huidige en nog steeds veranderende klimaat. Hierbij spelen de mycorrhizaschimmels een belangrijke rol. In het kader van dit onderzoek worden twee experimenten uitgevoerd om informatie te verzamelen over de opname van N-bevattende structuren en de enzymatische activiteit in heidebodem.

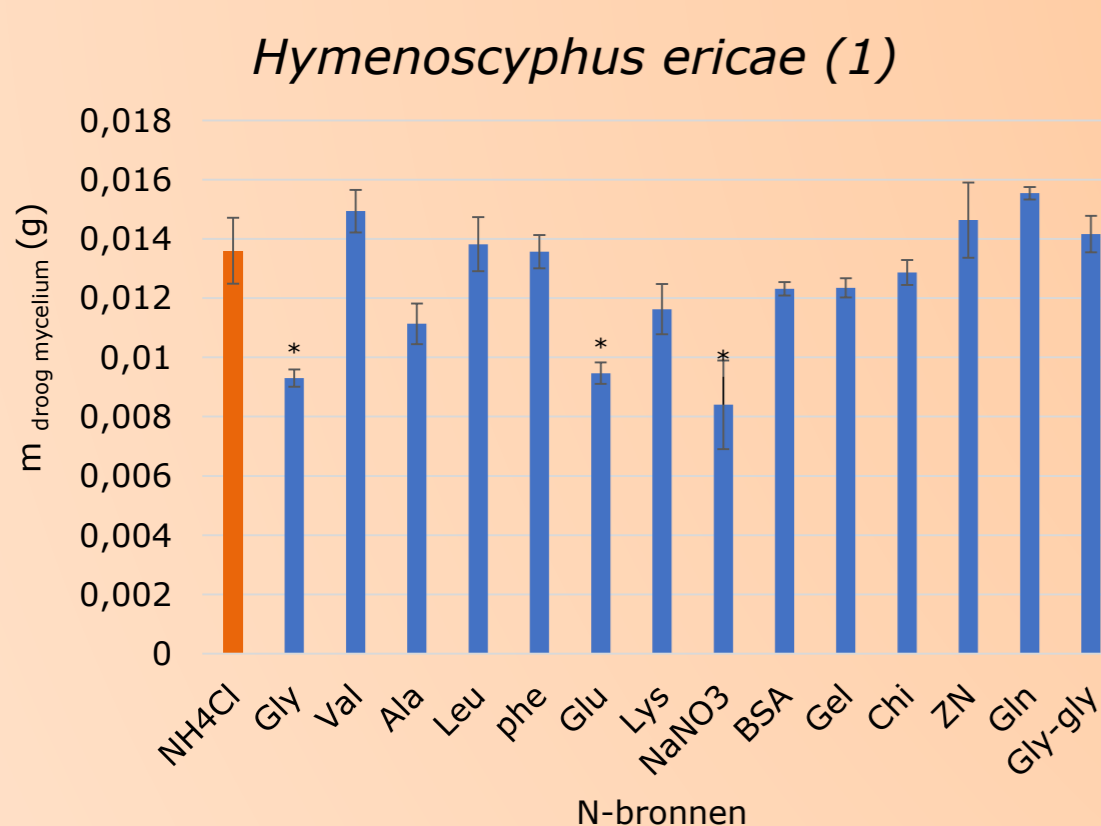


1. Screening van 15 relevante en uiteenlopende stikstofbronnen, gaande van aminozuren tot eiwitten, bij mycorrhizaschimmels.



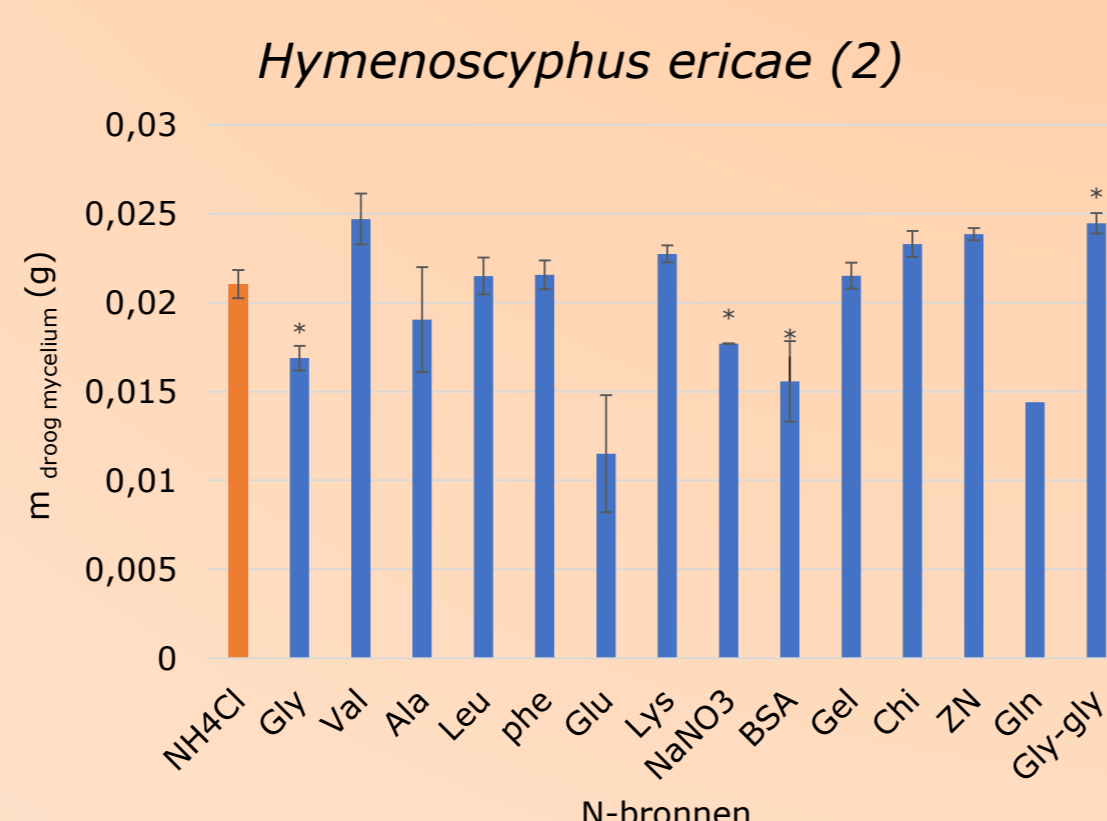
2. Bepaling van de enzymatische activiteit van het enzym chitinase, geproduceerd door mycorrhizaschimmels in heidebodem, dat chitine hydrolyseert.

1. Screening N-bronnen



Deze studie toonde aan dat de mycorrhizaschimmel een breed spectrum van aminozuren en eiwitten gebruikt als N-bron. Dit komt dus overeen met wat eerder werd aangetoond door Bajwa R. en Read D. J. [2]. De meeste aminozuren worden even gemakkelijk opgenomen als NH₄Cl door beide *H. ericae* aangezien er geen significant verschil is in de massa van het mycelium bij deze aminozuren ten opzichte van NH₄Cl.

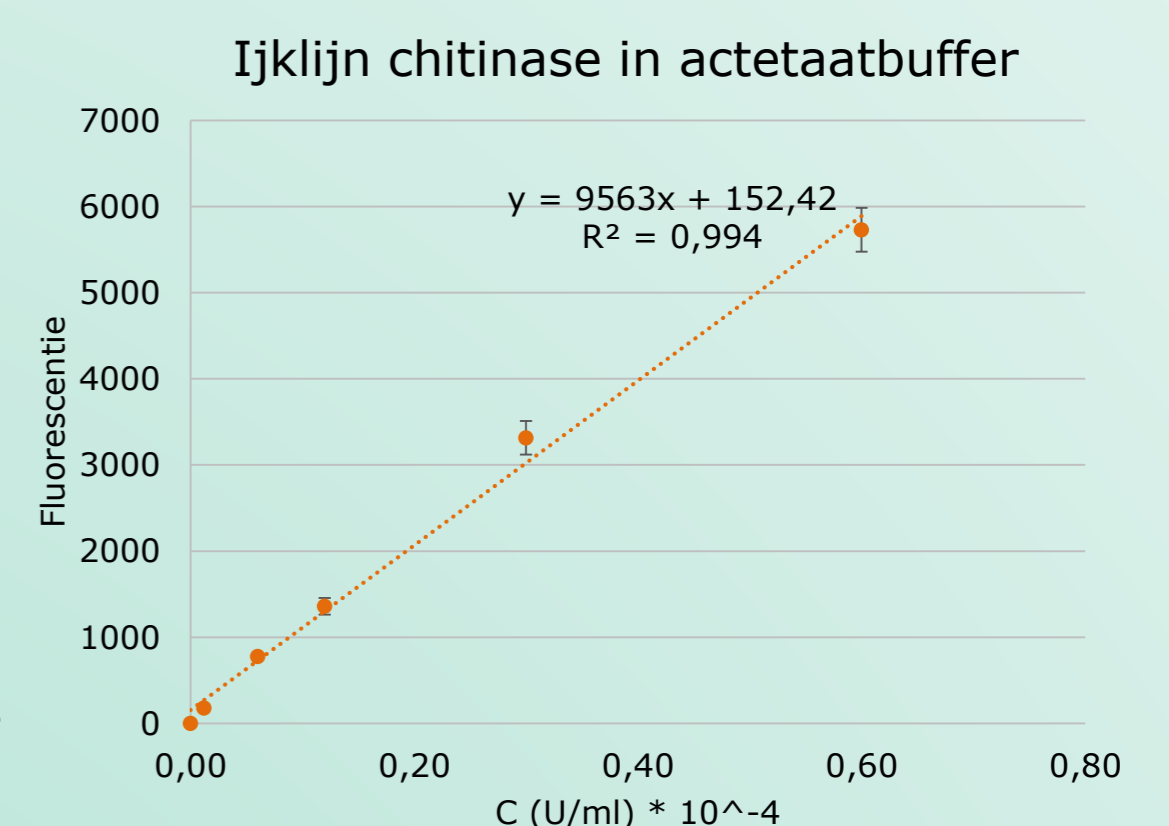
Beide schimmels groeien significant minder goed op glycine en NaNO₃ (Figuur 2 & 3). Dit is ook van toepassing voor het tweede isolaat bij BSA. Dit laatste kan te wijten zijn aan de hoge N-energiekost voor de productie van de hydrolytische enzymen. Het is ook opmerkelijk dat de mycorrhizaschimmel even makkelijk groeit op medium zonder N-bron als op medium met NH₄Cl. Dit kan worden toegeschreven aan de opstapeling van de N-reserves in het verleden.



Figuur 2 & 3: De getoonde resultaten zijn de gemiddelde massa's van het droge mycelium van 6 herhalingen voor de 15 N-bronnen. De significante verschillen ($p < 0,05$) ten opzichte van het standaardmedium met NH₄Cl als N-bron worden aangegeven door een ster boven elke kolom.

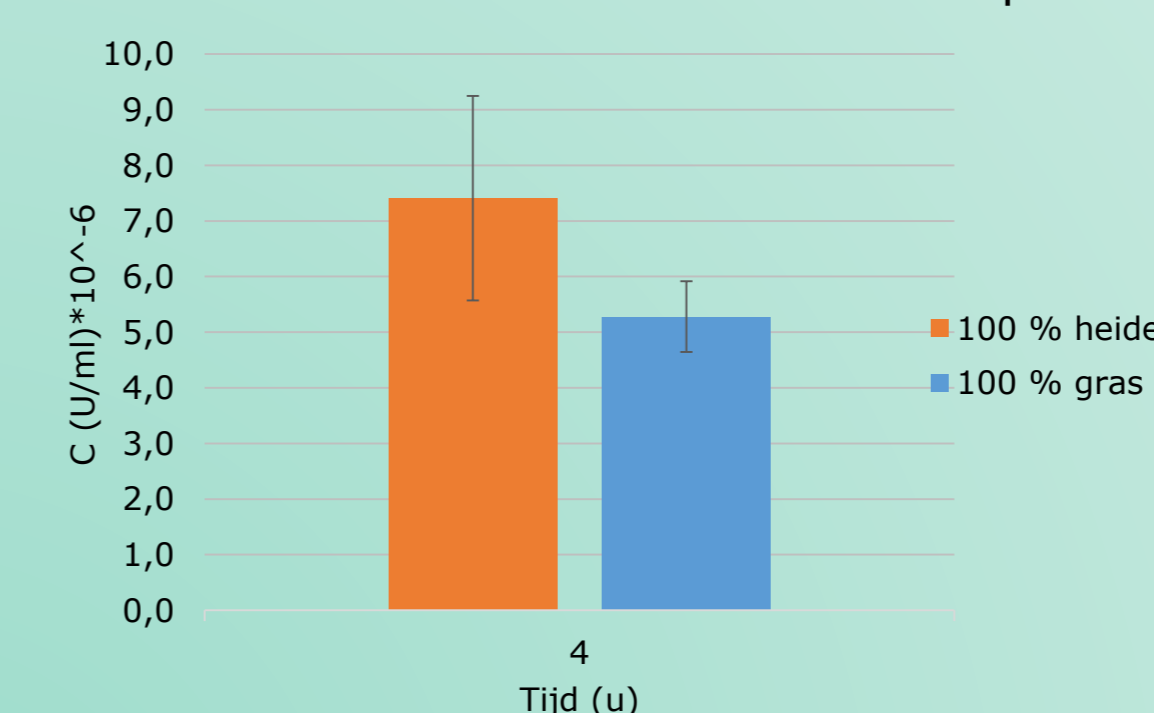
2. Chitinase-activiteit

Er werd een ijklijn van het enzym chitinase opgesteld via een reeks van zes enzymconcentraties met behulp van fluorescentiemetingen (Figuur 4). Als substraat werd 4-methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide gebruikt. De bekomen ijklijn werd gebruikt om de enzymatische concentratie of activiteit van chitinase te bepalen via vijf biologische herhalingen afkomstig van twee plots met een vegetatie van respectievelijk 100 % gras en 100 % heide.



Figuur 4: Ijklijn van chitinase door een reeks van zes concentraties waarbij de fluorescentie op de y-as wordt weergegeven en de concentratie in units (U) per ml op de x-as.

Chitinase-activiteit van twee plots



Figuur 5: De gemiddelde enzymconcentratie van vijf biologische herhalingen per plot. De concentratie wordt weergegeven op de y-as in units per ml en de incubatietijd in uren op de x-as.

Vervolgens werd de gemiddelde enzymconcentratie berekend per plot en uitgezet (Figuur 5). Er is geen significant verschil tussen de gemiddelde concentratie van chitinase van beide plots gevonden. Binnen de plot met 100 % heidevegetatie werd wel veel variatie vastgesteld tussen de biologische herhalingen in vergelijking met de andere plot.

Conclusie

De mycorrhizaschimmel *H. ericae* groeit even makkelijk bij de meeste aminozuren als N-bron in vergelijking met NH₄Cl. Enkel het aminozuur glycine wordt significant minder makkelijk opgenomen ten opzichte van de N-bron NH₄Cl. Er werd vastgesteld dat er geen significant verschil is in chitinaseactiviteit tussen beide plots. Er was echter wel een grote variatie aanwezig binnen de fluorescentiewaarden van de biologische herhalingen van de heideplot. Op basis van deze data kunnen we concluderen dat verder onderzoek in de toekomst nodig is om de N-cyclus in het heidegebied verder op te helderen.

[1] R. L. Peterson and H. B. Massicotte, *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Ottawa: NRC Research Press, 2004.

[2] R. Bajwa and D. J. Read, 'Utilization of mineral and amino N sources by the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* and by mycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings of *Vaccinium*', *Trans. Br. Mycol. Soc.*, vol. 87, pp. 269-277, 1986.

Promotoren / Copromotoren: Prof. dr. François Rineau
 Ing. Liesbet Pauls
 Natascha Arnauts