

Арбускулярные микоризные грибы в почвенно-климатических условиях Беларуси

Екатерина Соловьева, Зинаида Алещенкова

Институт микробиологии НАН Беларуси

Арбускулярные микоризные грибы (АМГ), встречающиеся у 80% видов наземных растений, положительно влияют на рост и развитие растения-хозяина, увеличивая его обеспеченность фосфором и другими элементами минерального питания, повышая его устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды. Численность спор АМГ в почвах Беларуси составляла 80-171 шт/100 г ризосферной почвы. Изучение морфологии выделенных спор АМГ показало, что наиболее часто встречаемые в почвах споры АМГ имели сферическую и эллипсоидную форму, размер 50-250 мкм, цвет от бледно-кремового до желтовато-коричневого. Определение таксономического положения АМГ, формирующих симбиоз с тритикале, широко возделываемой в Беларуси зерновой культурой, выявило присутствие фракции ДНК группы *Glomus mosseae-intraradices*. Применение микробного препарата АгроМик, основанного на азотфиксирующих и фосфатмобилизующих штаммах ризобактерий (*R. rhizogenes* БИМ В-486Д, *P. lini* БИМ В-485Д) и АМГ рода *Glomus*, способствует увеличению урожайности тритикале на 4,5-16,6 ц/га по сравнению с необработанными растениями (в зависимости от фона минеральных удобрений).

Арбускулярные микоризные грибы, тритикале, инокуляция

Введение

Микориза, которая образуется при колонизации грибами корней растений, является наиболее древней формой симбиоза растений с микроорганизмами (возникла 600 млн. лет назад, бобово-ризобияльный симбиоз – 60-70 млн. лет назад) (Каратыгин, 2005). Из 7 типов микориз наибольшее распространение имеют арбускулярные микоризные грибы (АМГ), образуемые у 80% видов наземных растений представителями класса *Zygomycetes* порядка *Glomales* (Крипка и др., 2002, Siddiqui et al., 2011).

Арбускулярные микоризные грибы положительно влияют на рост и развитие растения-хозяина, увеличивая его обеспеченность фосфором и другими элементами минерального питания, повышая их устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам (Koide et al., 2004, Pozo et al., 2010).

АМГ являются облигатными симбионтами, поэтому изучение их отдельно от растений, в чистой культуре, представляет собой большую сложность. Одними из основных критериев, по которым характеризуют АМГ, являются разнообразное влияние на рост растений и особенности спор грибов. Однако употребляя только эти критерии, очень сложно получить данные для описания АМ-растительных симбиозов (Крипка и др., 2002).

Традиционно идентификация АМГ основана на морфологических особенностях их спор. Таким образом, были описаны более 150 видов АМГ (Walker et al., 1993). Однако данный способ идентификации является сложным для определения различий между родами и видами, не отражает в полной мере степень инфицирования корней АМГ и затруднен тем, что образование спор (споруляция) зависит от физиологических свойств грибов и растения-хозяина, условий окружающей среды (Cho et al., 2006). При отсутствии спор интраадикальный мицелий грибов дает возможность идентифицировать АМГ до семейства. Морфологический анализ окрашенных структур АМГ (арбускулы, везикулы, гифы) в корнях растений позволяет судить о степени инфицирования корневой системы растения грибами (Vierheilg et al.,

2005). Данный метод требует дальнейшей доработки, однако очень удобен при изучении сезонных и пространственных вариаций АМ симбиозов (Merryweather et al., 1998). Существуют различные модификации данного метода, одной из которых является совмещение процесса окраски структур АМГ с молекулярно-генетическим анализом грибов, что позволяет оценить не только интенсивность развития микоризной инфекции в корне растения, но и идентифицировать симбионтов (Pitet et al., 2009). Использование молекулярно-генетических методов, как наиболее быстро, легко воспроизводимого и достоверного способа определения видового состава микробиологических объектов, является актуальным на сегодняшний день.

Полимеразная цепная реакция позволяет идентифицировать АМГ, используя как споры грибов, так и корни растений-хозяев, колонизованные грибами, и почвенные образцы (Lanfranco et al., 1995). В 1994 г. был разработан метод экстракции и рестрикционного анализа ДНК из спор АМГ и получены первые библиотеки генов для АМГ. Franken создал генетические библиотеки для *G. mossea* и *Scutellospora castanea* (Franken et al., 1996).

У АМГ первыми были секвенированы гены малых субъединиц рДНК (SSU) и рибосомальный внутренний транскрибируемый спейсер (ITS). Регионы ITS широко используются для молекулярной таксономии, однако проявляют высокий уровень вариации внутри видов АМГ и даже в пределах единичных спор. Таким образом, с помощью анализа ITS последовательностей трудно обнаружить отличительные черты, общие для всех АМГ, но не проявляемые в других организмах. SSU ген является менее варибельным, чем ITS (Lee et al., 2008). Дальнейшие исследования, включая анализ случайной амплификации участков ДНК (RAPD), дали возможность получить пары специфических праймеров для многих видов АМГ (Krüger et al., 2009). Сравнение последовательностей, кодирующих ядерную малую субъединицу (18S рДНК), использовали для установления связей между разными таксономическими группами АМГ (Öpik et al., 2006).

Таким образом, в течение 20 последних лет учеными было разработано большое количество рДНК-праймеров для детекции АМГ, присутствующих в малом количестве и в сложных образцах. Действительно, есть специфические праймеры, позволяющие идентифицировать некоторые виды АМГ, выделенные из окружающей среды. Тем не менее, на данный момент не существует оптимального набора праймеров и методов анализа для оценки микоризного разнообразия во всех возможных агроэкологических условиях, что является предметом дальнейших исследований в данной области (Covacevich, 2010).

В связи с этим целью наших исследований было изучение распространения АМГ в почвенно-климатических условиях Беларуси, выделение и отбор конкурентоспособных штаммов АМГ, образующих эффективный симбиоз с тритикале, широко возделываемой в Беларуси.

Микробиологические объекты: АМГ, выделенные из ризопланы и ризосферы тритикале.

Растительные объекты: тритикале.

Методика исследования

Выделение спор АМГ из почвы проводили методом мокрого просеивания (Лабутова, 2000). Учет спор проводили с помощью бинокулярной лупы при увеличении $\times(20-40)$. Морфологию выделенных спор АМГ изучали с помощью трансмиссионной микроскопии (JEM-100СХ, Япония).

Поиск, выделение и скрининг эффективных культур АМГ, быстро и интенсивно колонизирующих корни тритикале, проводили согласно рекомендациям Н.М. Лабутовой. Количественный учет развития АМГ в образцах корней оценивали по модифицированному методу Травло с помощью микроскопа МБИ-15 в проходящем свете при увеличении $\times(80-100)$.

Выделение ДНК из корней тритикале, инфицированных АМГ, проводили СТАВ-методом, почвы – PEG-методом (Падутов и др., 2007). Таксономия грибов, микоризирующих корневую систему тритикале, устанавливалась с использованием праймеров: универсальных для грибов (ITS1 и ITS4); универсального для эукариот NS31 и специфического для арбускулярной микоризы AM1 - для выявления фрагмента SSU rDNA размером 590 б.р.; специфических на АМГ группы *Glomus mosseae-intraradices* LSURK 4f/LSURK 7r – для выявления фрагмента LSU rDNA размером 300 б.р. (Örik, 2004). Способность выделенного инокулюма АМГ инфицировать растения плектрантуса с целью его размножения и хранения устанавливалась с использованием универсальных для грибов праймеров (ITS1 и ITS4).

Результаты и обсуждение

С целью изучения распространения АМГ в почвенно-климатических условиях Беларуси был проведен анализ почв на присутствии в них спор АМГ. Методом мокрого просеивания были выделены и

подсчитаны споры АМГ из почвы следующих вариантов: 1 - дерново-подзолистая (лесная) почва, Минская область, зимний период; 2 - дерново-подзолистая (луговая), Глубокский район, Витебская область, летний период; 3 - дерново-подзолистая (естественный биоценоз), Новополоцк, Витебская область, весенний период; 4 - дерново-подзолистая (луговая), Брест, летний период; 5 - дерново-подзолистая (луговая), Новогрудский район, Гродненская область, весенний период; 6 - дерново-подзолистая (луговая), Кричев, Могилевская область, зимний период; 7 - дерново-подзолистая (луговая), Воложинский район, Минская область, весенний период; 8 - дерново-подзолистая (луговая), Гомельская область, осенний период; 9 - дерново-подзолистая (лесная), Гомельская область, летний период; 10 - торфяно-болотная (луговая), Брестская область, летний период (рис. 1).

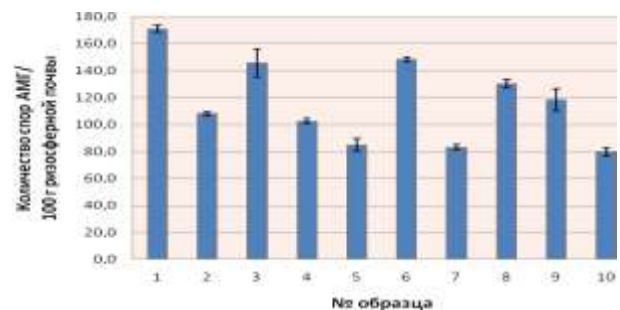


Рис. 1 – Количественный учет спор АМГ в почвах Беларуси

численность спор АМГ в почвах Беларуси составила 80-171 шт/100 г ризосферной почвы и варьировала от типа почвы, степени ее окультуренности, вида растительного покрова, сроков взятия образцов, а также от содержания в ней фосфора.

Изучение морфологии выделенных спор АМГ, проведенное с помощью трансмиссионной и световой микроскопии, показало, что наиболее часто встречаемые в почвах споры АМГ имели сферическую и эллипсоидную форму (рис. 2), размер 50-250 μm , бледно-кремовый и желтовато-коричневый цвет. Цвет спор АМГ зависит от их возраста: молодые споры имеют более светлую окраску, старые – темнее.

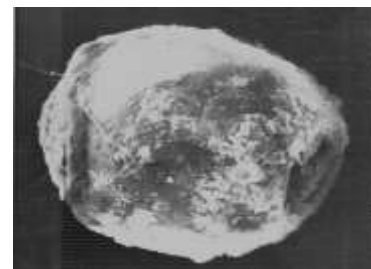


Рис. 2 – Споры АМГ, выделенная из дерново-подзолистой (лесной) почвы, отобранной в Минской области в зимний период (электронное микрофотографирование, ув. 2000)

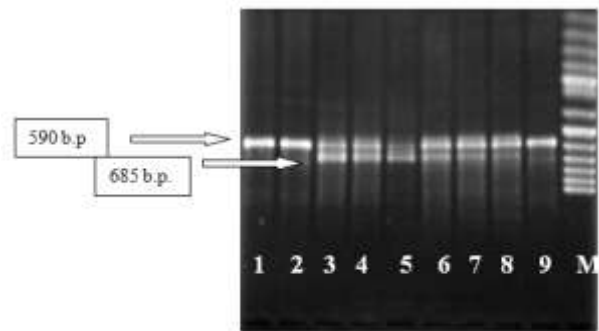
Сравнение полученных результатов с данными по содержанию АМГ в различных почвах мира свидетельствует о необходимости проведения

искусственной предпосевной микоризации семян сельскохозяйственных культур с целью улучшения их минерального питания и повышения устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам. В связи с этим дальнейшая работа заключалась в выделении и отборе арбускулярно-микоризной популяции, формирующей эффективный симбиоз с тритикале, с целью ее дальнейшей интродукции в ризосферу растений.

Скрининг эффективных культур АМГ представляет собой результат многоступенчатой селекции обитающих в почве эндофитов. Одна из причин длительного скрининга состоит в том, что, хотя АМГ не проявляют особой специфичности в выборе растения-хозяина, образующийся симбиоз не всегда приводит к улучшению роста растения. Поэтому необходим подбор пары АМГ-растение, формирующих эффективный симбиоз. На функционирование симбиоза большое влияние также оказывают почвенные условия (обеспеченность элементами питания, в особенности, фосфором, степень окультуренности и др.). Следовательно, при отборе штаммов необходим поиск АМГ, способных образовывать эффективный симбиоз с растениями в разных почвенных условиях. Кроме того, эффективные штаммы должны успешно конкурировать с аборигенными эндофитами и быстро колонизировать корни растений (Лабутова, 2000).

Работа по выделению штаммов АМГ, формирующих эффективный симбиоз с тритикале, была начата с обследования агроценозов тритикале и отбора корневой системы и прикорневой почвы у высокопродуктивных здоровых растений в фазе созревания. Микроскопирование окрашенных раствором анилинового синего образцов корневой системы тритикале показало высокую степень инфицирования корней АМГ. Частота встречаемости микоризной инфекции (F) в корнях тритикале составила 85%. Корневая система тритикале, отобранная для выделения эффективной культуры АМГ, характеризуется высоким обилием структур АМГ (мицелий, везикулы, арбускулы). Высокая насыщенность корневой системы тритикале структурами АМГ свидетельствует о том, что данный микоризный материал может быть использован в качестве инокулюма.

Далее наше внимание было сфокусировано на изучении состава АМГ, представленного в выделенном нами микоризном инокулюме, с помощью молекулярно-генетического анализа. Первоначальным этапом явилось выделение суммарной ДНК из почвы и корней растений тритикале (Соловьева, 2010). Установление таксономического положения АМГ, выделенных из агроценоза тритикале, проводили при помощи различных праймеров. В ходе проведенной амплификации образцов ДНК с праймерами ITS1 и ITS4 были получены ПЦР-спектры (рис. 3).

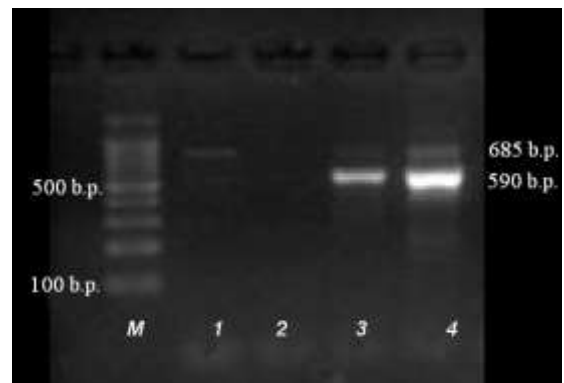


1,2,9 – почвенный инокулюм АМГ, выделенный из агроценоза тритикале; 3-5 – корни яровой тритикале, инокулированной выделенным инокулюмом АМГ; 6-8 – корни озимой тритикале, инокулированной выделенным инокулюмом АМГ; М – маркер молекулярного веса

Рис. 3 – Электрофоретический спектр ПЦР-продуктов с использованием праймеров ITS1 и ITS4 (локусы рДНК), выделенных из корней тритикале

Поскольку праймеры ITS1 и ITS4 являются универсальными для большинства грибов и растений, то кроме АМГ амплифицируется и локус растения-хозяина. Установлено, что во всех образцах (кроме №1, 2, 9) содержится фракция ДНК тритикале, размер которой составляет 685 пар нуклеотидов. Во всех исследуемых образцах присутствует фракция АМГ размером в 590 пар оснований, соответствующая роду *Glomus*.

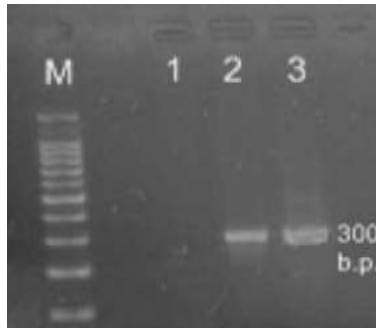
На следующем этапе работы проводилась амплификация образцов ДНК с использованием специфических для АМГ праймеров (рис. 4, 5).



М – молекулярный маркер; 1 – корни яровой тритикале, культивируемой в стерильных условиях; 2 – стерильная почва; 3 – почвенный инокулюм АМГ, выделенный из агроценоза тритикале; 4 – почвенно-корневой инокулюм АМГ, выделенный из агроценоза тритикале

Рис. 4 – ПЦР-спектры образцов при использовании универсального для эукариот (NS31) и специфического для АМГ (AM1) праймеров

Как видно из рисунка 4, образцы № 1 и 4 содержат фракцию ДНК тритикале. Образцы № 3 и 4 содержат четко выраженную фракцию ДНК АМГ размером 590 пар нуклеотидов. Дальнейшее определение видовой принадлежности АМГ в исследуемых образцах проводили с использованием праймеров, специфических для группы *Glomus mosseae-intraradices* LSURK 4f/LSURK 7г (рис. 5).



М – молекулярный маркер; 1 – стерильная почва; 2 – почва, отобранная в варианте с яровой тритикале, обработанной инокулятом АМГ, вегетационный стерильный опыт; 3 – почвенный инокулятом АМГ, выделенный из агроценоза тритикале
Рис. 5 – Электрофоретический спектр ПЦР-продуктов, полученных с праймерами LSURK 4f и LSURK 7r

Анализ ПЦР-продуктов, полученных при участии специфических для АМГ праймеров LSURK 4f и LSURK 7r, выявил присутствие фракции ДНК АМГ группы *Glomus mosseae-intraradices* размером в 300 пар нуклеотидов у образцов № 2 и 3, что подтверждает полученные ранее с помощью праймеров ITS1 и ITS4, NS31 и AM1 данные о присутствии АМГ рода *Glomus* в составе выделенной нами из агроценоза тритикале популяции арбускулярной микоризы, используемой в качестве инокулянта растений.

На основе выделенной популяции АМГ рода *Glomus* и штаммов ассоциативных азотфиксирующих и фосфатмобилизующих ризобактерий (*R. rhizogenes* БИМ В-486Д, *P. lini* БИМ В-485Д) нами разработан микробный препарат АгроМик для повышения урожайности тритикале. Установлено, что предпосевная обработка семян и обработка вегетирующих растений АгроМиком способствует увеличению урожая зерна тритикале на 4,5-16,6 ц/га по сравнению с необработанными растениями (в зависимости от фона минеральных удобрений) (Solovyova et al., 2015).

Выводы

В результате проведенных исследований установлена численность спор АМГ в почвах различных регионов Беларуси (80-171 шт/100 г почвы), свидетельствующая о необходимости проведения искусственной предпосевной микоризации семян сельскохозяйственных культур. В составе отобранной эффективно микоризирующей корня тритикале популяции методами молекулярно-генетического анализа установлены АМГ группы *G. mosseae-intraradices*, используемые наряду с азотфиксирующими и фосфатмобилизующими штаммами ризобактерий (*R. rhizogenes* БИМ В-486Д, *P. lini* БИМ В-485Д) в качестве основы микробного препарата АгроМик. Использование микробного препарата АгроМик для предпосевной инокуляции семян и обработки вегетирующих растений перспективно для повышения продуктивности

тритикале и получения экологически чистого зерна в агроэкологических условиях Беларуси.

Литература

1. CHO, N-S., KIM, D-H., EOM, A-H. ET al. Identification of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in Korea by morphological and DNA sequencing features of their spores. *J. Fac. Agr.*, 2006, Vol. 51, № 2, p. 201–210.
2. COVACEVICH, F. Molecular tools for biodiversity and phylogenetic studies in mycorrhizas: the use of primers to detect arbuscular mycorrhizal. *Mycorrhizal biotechnology*, 2010, Chapter 13, p. 186–202.
3. FRANZEN, P., GIANINAZZI-PEARSON V. Construction of genomic phage libraries of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Scutellospora castanea* and isolation of ribosomal RNA genes. *Mycorrhiza*, 1996, Vol. 6, p. 167–173.
4. КАРАТЫГИН, ИВ. Грибы как компоненты экосистем прошлого. *Ботанический журнал*, 2005, №9, с. 1297–1318.
5. КРИПКА, АВ., СОРОЧИНСКИЙ БВ., ГРОДЗИНСКИЙ ДМ. Молекулярные и клеточные аспекты развития арбускулярных микоризных симбиозов и их значение в жизнедеятельности растений. *Цитология и генетика*, 2002, Т. 36, № 4, с.72–81.
6. KOIDE, RT., MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhizal. *Mycorrhiza*, 2004, № 14, p. 145–163.
7. KRÜGER, M., STOCKINGER, H., KRÜGER, C. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 2009, Vol. 183, p. 212–223.
8. ЛАБУТОВА, НМ. Методы исследования арбускулярных микоризных грибов. Всесоюз. НИИ с.-х. микробиологии, Санкт-Петербург, 2000, 24 с.
9. LANFRANCO, I., WYSS, P., MARZACHI, C. ET al. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolator of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.*, 1995, Vol. 4, p. 61–68.
10. Lee, J., Lee, S., Young, JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, Vol. 65, p. 339–349.
11. MERRYWEATHER, J., FITTER, A. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. *New phytol.*, 1998, Vol. 138, p. 117–129.
12. ÖPIK, M., MOORA, M., LIIRA, J. et al. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J. of Ecology*, 2006, Vol. 94, p. 778–790.
13. ÖPIK, M. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of perennial plants and their effect on plant performance : dis. ... doctor of philosophy (in plant ecology and ecophysiology), Tartu, 2004, 175 p.
14. ПАДУТОВ, ВЕ., БАРАНОВ, ОЮ., ВОРОПАЕВ, ЕВ. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск, 2007, 176 с.
15. PITET, M., CAMPRUBI, C., CALVET, C. et al. A modified staining technique for arbuscular mycorrhiza compatible with molecular probes. *Mycorrhiza*, 2009, Vol. 19, p. 125–131.
16. POZO, MJ., JUNG, SC., LÓPEZ-RÁEZ, JA. et al. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defense mechanisms. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, 2010, Chapter 9, p. 193–207.
17. SIDDIQUI, ZA., KATAOKA, R. Mycorrhizal inoculants: progress in inoculant production technology. *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*, 2011, Chapter 18, p. 489–506.
18. SOLOVYOVA, E., ALESCHENKOVA, Z. Microbial preparation AgroMyc promoting productivity of triticale. Book of abstracts 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdansk. University of Gdansk, 2015, p. 84.
19. СОЛОВЬЕВА, ЕА. Выделение и молекулярно-генетический анализ ДНК арбускулярных микоризных грибов, инфицирующих корневую систему тритикале. *Иммунопатология. Аллергология. Инфектология*. 2010, № 1, с. 130.
20. VIERHEILIG, H., SCHWEIGER, P., BRUNDRETT, M. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, 2005, Vol. 125, p. 393–404.
21. WALKER, C., TRAPPE, JM. Names and epithets in the Glomales and Endoganales. *Mycol. Res.*, 1993, Vol. 97, p. 339–344.

Ekaterina Solovyova, Zinaida Aleschenkova

Arbuscular mycorrhizae in agroecosystems of Belarus

Summary

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) detected in 80% of terrestrial plant species promote growth and development of vegetable hosts, enhance assimilation of phosphorus and other mineral nutrients, raise resistance to adverse environmental conditions. AMF are known to act as obligate symbionts, existing as resting spores outside plant hosts, which complicates the related studies. The concentration and diversity of AMF depends on numerous factors, prevalently on soil type. The exhaustive data on presence and composition of AMF species in different soils is a vital prerequisite for successful implementation of artificial mycorrhization of cultivars. To evaluate spreading of AMF spores in Belarusian soils they were isolated by wet sieving technique (Labutova, 2000). Morphology of isolated AMF spores was examined by transmission electron microscopy (JEM-100CX, Japan). Taxonomic affiliation of AMF forming symbiotic relationship with triticale was performed by molecular-genetic methods using primers specific for AMF of genus *Glomus* (Öpik, 2004). The number of AMF spores varied in the range 80-171 spores/100 g of rhizospheric soil. Analysis of amplified PCR products has revealed DNA fraction of AMF representing group *Glomus mosseae-intraradices*. Nitrogen-fixing strain *R. rhizogenes* BIM B-486Д, phosphate-mobilizing strain *P. lini* BIM B-485Д and AMF of genus *Glomus* were selected as the basis of microbial preparation AgroMyc to raise triticale harvests and to reduce doses of applied mineral fertilizers.

Arbuscular mycorrhizal fungi, triticale, inoculation

Получено в марте 2016, подписано в печать в апреле 2016

Екатерина СОЛОВЬЕВА. Научный сотрудник Института микробиологии НАН Беларуси. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. +37529-3959308, адрес эл. почты: ekatyatut.by

Ekaterina SOLOVYOVA. Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), researcher. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. +37529-3959308, e-mail: ekatyatut.by

Зинаида АЛЕЩЕНКОВА. Доктор биологических наук, заведующая лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений. Адрес: ул. ак. Купревича, 2, 220141, Минск, Беларусь. Тел. 8017-2659967, адрес эл. почты: aleschenkova@mbio.bas-net.by

Zinaida ALESCHENKOVA. Institute of Microbiology, National Academy of Sciences (NAS), doctor of biological sciences, head of the lab of soil microorganisms-plants interactions. Address: Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Belarus. Tel. 8017-2659967, e-mail: aleschenkova@mbio.bas-net.by