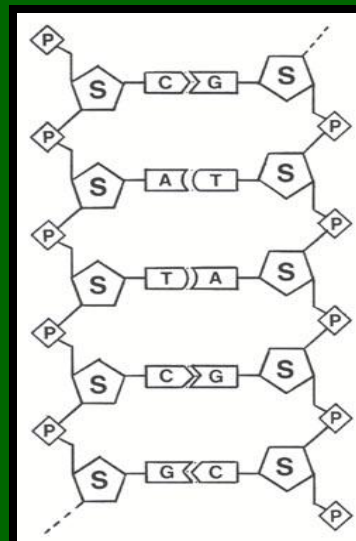




Методы исследования микориз и микоризообразующих грибов

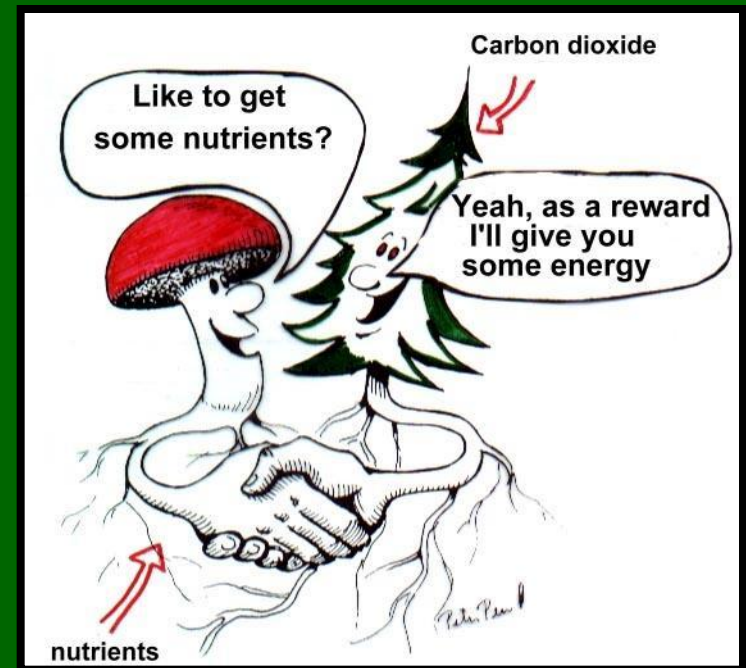


Микориза

– эволюционно сложившийся структурно оформленный симбиоз, необходимый для одного или обоих партнеров, между грибом и корнем (или иным контактирующим с субстратом и осуществляющим транспорт веществ органом) живого растения. Микоризы развиваются в специализированных органах растений, где тесный контакт между симбионтами является результатом синхронного развития. Микоризные симбиозы представляют собой континуум от мутуалистических до паразитических взаимоотношений, и положение в нем определяется видовой принадлежностью симбионтов, факторами окружающей среды и возрастной стадией симбиоза.

Микориза :

- структура - модифицированная часть корня, заселенная грибом-микоризообразователем (= *микоризное окончание*)
- тип трофических взаимоотношений между корневой системой растения и микобионтом (= *микотрофия*)



Арбускулярная микориза (АМ)

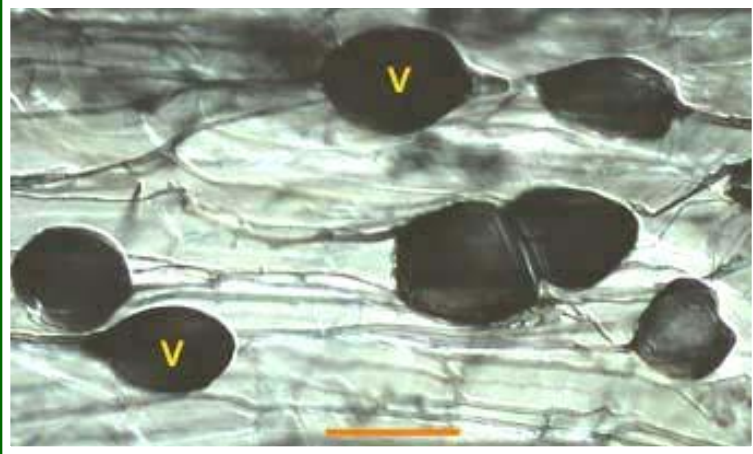
- **Образуют:** около **200 видов грибов** (отд. *Glomeromycota*), около **300 тыс. видов растений**, преимущественно травянистых.
- **Распространены повсеместно**, преобладают в тропиках, где отсутствует сезонность, а для почв характерно низкое содержание органики.



арбускула

- **древовидно
разветвленная гаустория в
коровой клетке**

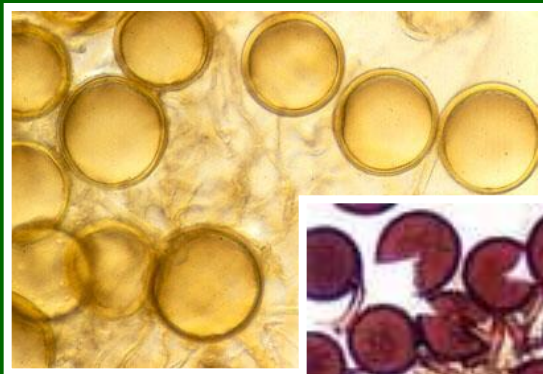
Арбускулярная микориза (АМ)



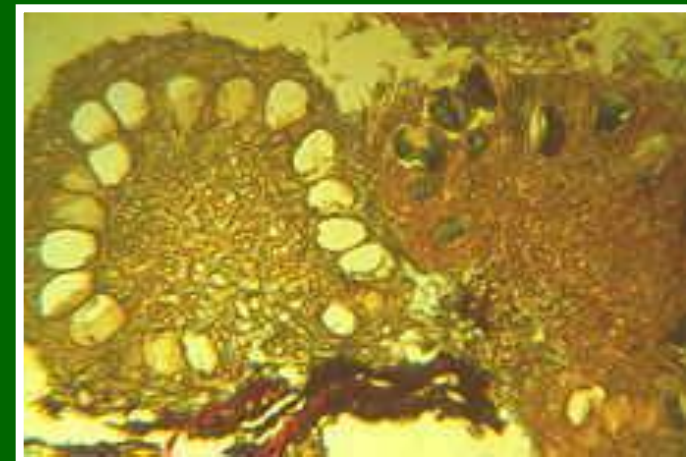
везикулы

- запасающие структуры
внутри тканей растения

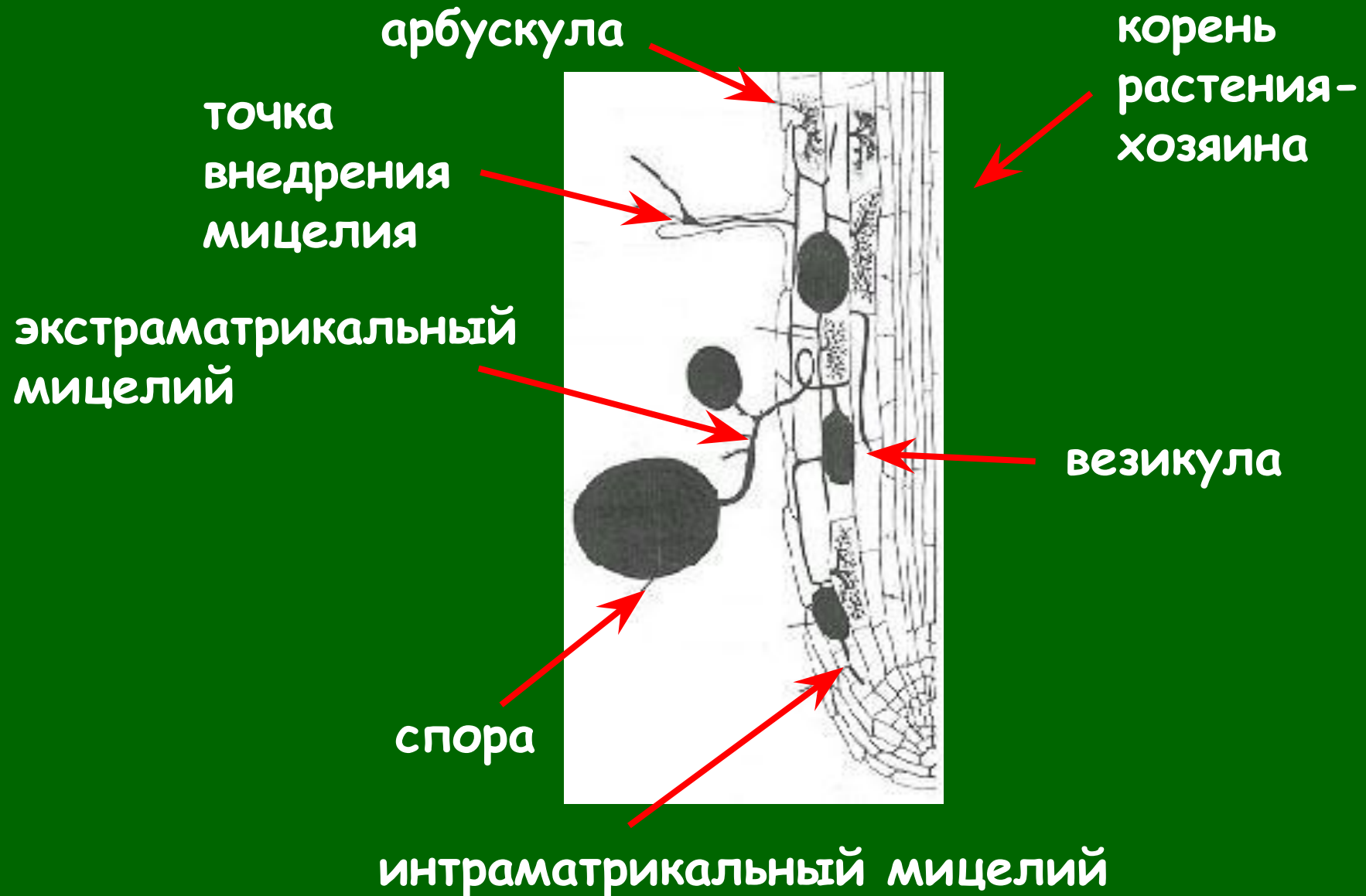
хламидоспоры - пропагулы, запасающие
структуры на свободном
мицелии в почве



«спорокарп»



Арбускулярная микориза (АМ)



Типы микориз

Эктомикориза

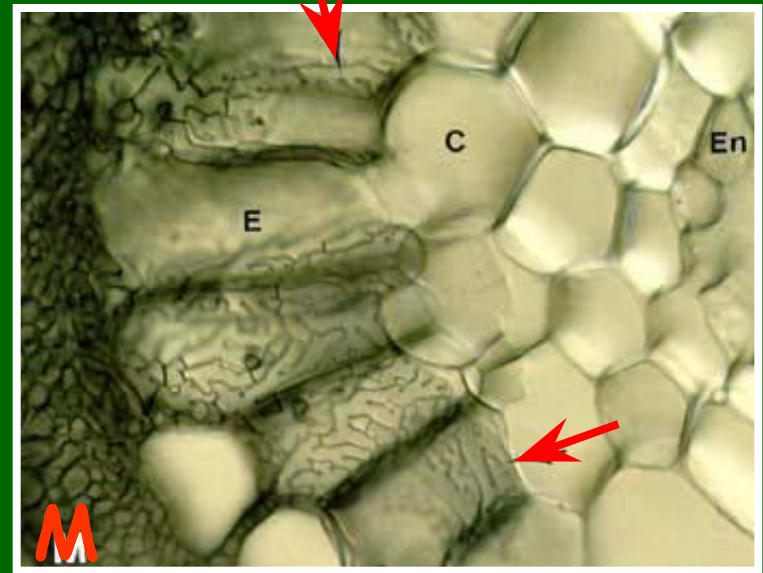
- **Образуют:** около 6 тыс. видов грибов (преимущественно Агарикоидные, отд. Basidiomycota, реже представители отд. Ascomycota), часто специфичные к хозяину около 5-6 тыс. видов растений, почти исключительно древесных или кустарников.
- Преобладают в лесах умеренной зоны с выраженной сезонностью и высоким содержанием органики в почвах.





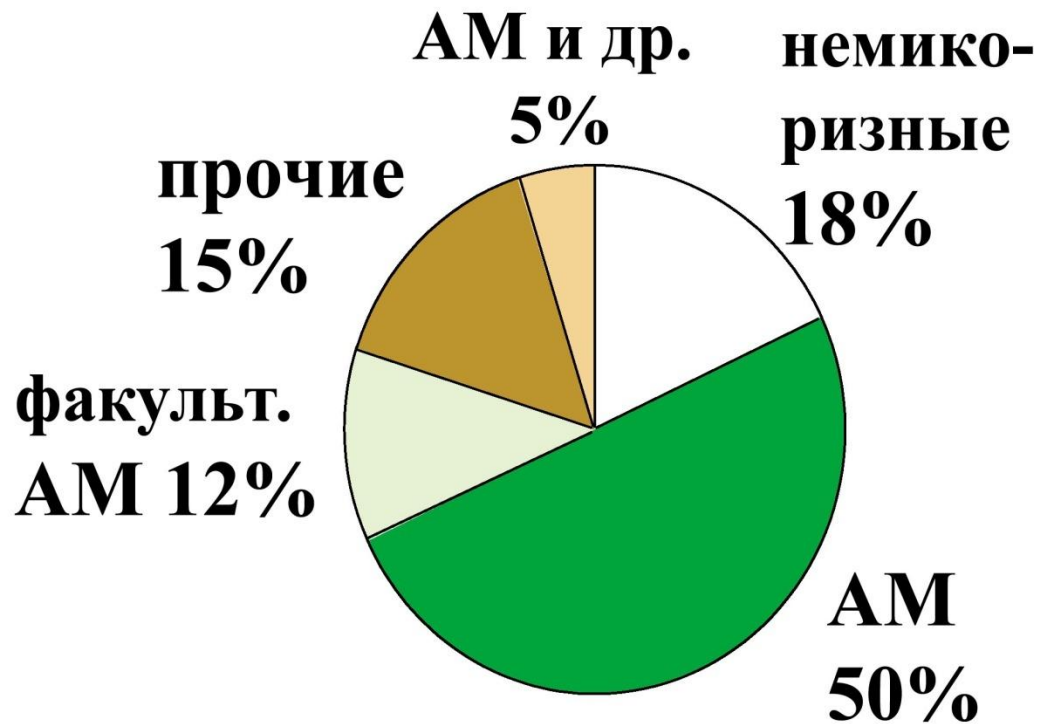
Эктомикориза (ЭМ)

Характерны
морфологические
изменения
корневой системы,
заселенной
микобионтом



Чехол (М) - на поверхности
корня, от чехла отходят в почву
наружные (свободные,
экстрamatриальные) гифы
Сеть Гартига (стрелки) - в
эпидермисе и коре

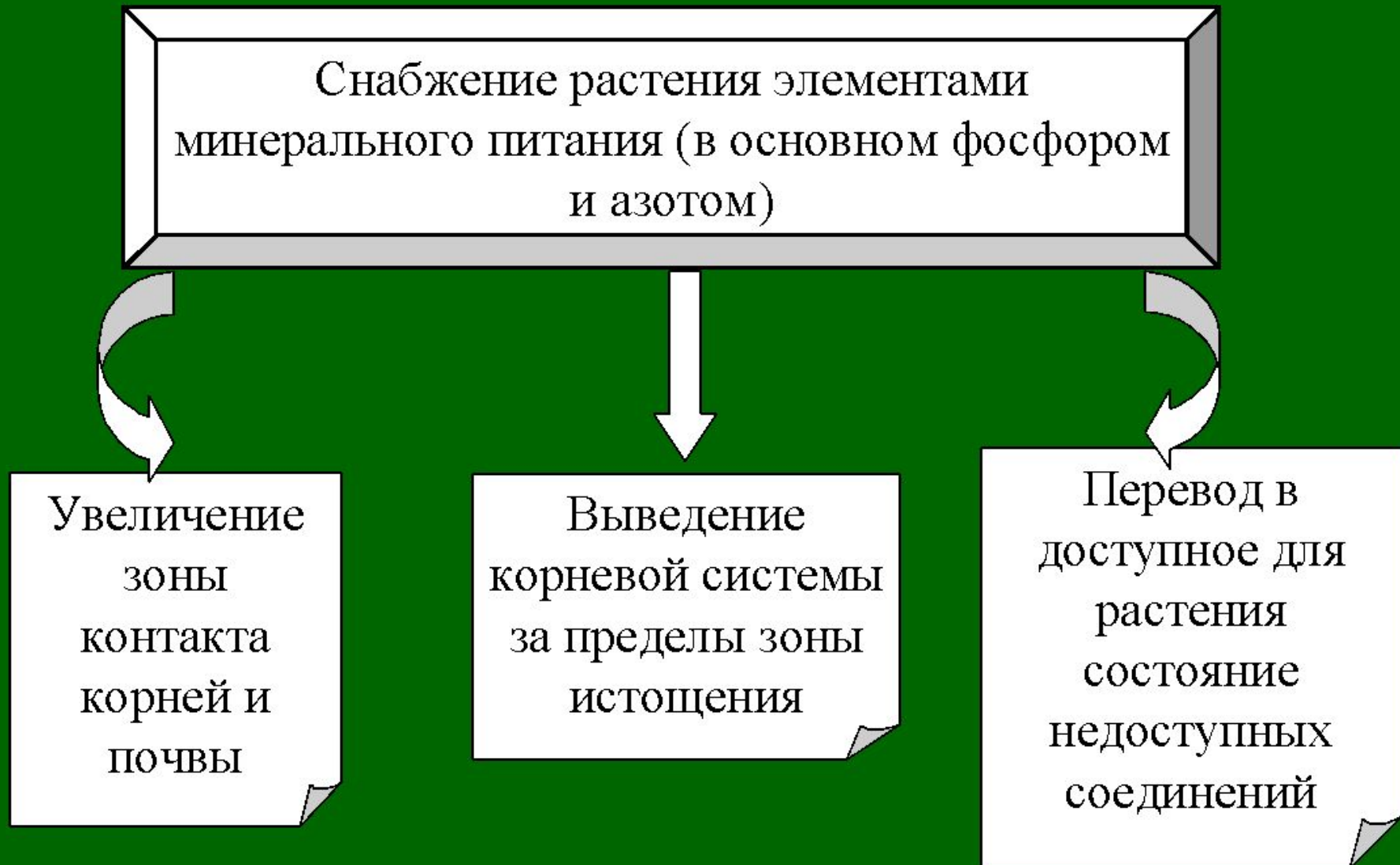
Распространенность микориз среди групп растений



Типы микориз у Покрытосеменных
(по Trappe, 1987)

- **82%** наземных растений принимает участие в микоризных симбиозах
- Покрытосеменные: микотрофны **75%** Однодольных и **80-90%** Двудольных
- Голосеменные – **100%**
- Ряд видов **споровых растений и мохообразных**

Роль микоризы в жизни растения



Роль микоризы в жизни растения

**регуляция фотосинтеза
растения**

**улучшение водного режима
растения**

**повышение устойчивости
к засолению**

**снижение поступления
металлов
в побеги растений**

Роль микоризы в жизни растения

защита корневых систем от патогенных почвенных микроорганизмов и беспозвоночных

утилизация
корневых
экссудатов

выделение
микоризными
грибами
биологически
активных
веществ

селектирующее
действие на
организмы
корневой
зоны

механически-
за счет чехла
(ЭМ)

стимуляция
растения к
выработке
защитных
веществ

Роль микоризы в экосистемах

предоставление растению-хозяину
преимущества в конкурентной борьбе

подавление
видов не-хозяев

снижение
внутривидовой
конкуренции
за счет
перераспределения
веществ

повышение
жизнеспособности,
улучшение
обмена

Роль микоризы в экосистемах

участие в
круговоротах
биогенных
элементов, их
интенсификация

запасание
микоризными
грибами органики
в почве, изменение
количества
и состава веществ

предотвращение
утраты
веществ из
экосистемы

поддержание
энергетической
устойчивости
системы

Роль микоризы в экосистемах

- Транспорт углерода от растений к другим организмам
- Интеграция сообществ в единое целое, перераспределение биогенных веществ:
 1. от одних видов к другим
 2. от отмерших растений к живым
 3. от взрослых деревьев к сеянцам

Микоризная сеть:
передача веществ от
взрослого дерева к
сеянцу через мицелий
эктомикоризного
гриба



•Снижение конкуренции и привнесение стабильности в сообщество

История исследования микориз



1881 – Die Vegetationsorgane
der *Monotropa hypopitys* L.
(Botanische Zeitung)

1886 – О симбиотическом
соединении мицелия грибов с
корнями высших растений
(Тр. СПб об-ва естествоиспытателей)

Каменский
Франц Михайлович
(1851 – 1913)

История исследования микориз

1885 - А.Б. Франком введен термин «микориза»

До 1920-х – преимущественно исследования анатомии и морфологии микориз различных типов, первые попытки культивирования грибов- микоризообразователей, дискуссии о пользе и вреде микориз для растения

1920-е – серед. 1950-х – выделение чистых культур, попытки синтеза микориз *in vitro*, вопросы применения микориз в лесоводстве и сельском хозяйстве, активные исследования арбускулярной микоризы

Конец 1950-х – начало 1990-х – изучение физиологии микориз с применением изотопных методов, эколого-ценотические исследования микосимбиотрофизма

История исследования микориз

В настоящее время исследования представлены следующими направлениями:

- Анализ отношений симбионтов на молекулярно-генетическом уровне, выявление природы сигналов, определяющих возникновение и развитие симбиоза
- Изучение филогении микоризообразующих грибов и эволюции микоризных симбиозов
- Анализ биотических связей микориз с другими группами организмов
- Оценка влияния специфичности микориз на структуру растительных сообществ
- Оценка роли микориз в восстановлении сообществ после нарушений, в особенности, антропогенных

Физиология растений Фитоценология

Прикладные исследования в лесоводстве и сельском хозяйстве



Взаимодействие
групп почвенной
биоты:
бактерии
микровицеты
беспозвоночные
(нематоды,
насекомые)
Биоконтроль
Свойства почвы

Физиология грибов
Экология
грибов
Биоразнообразие
микобионтов

Отбор образцов арбускулярной микоризы для анализа

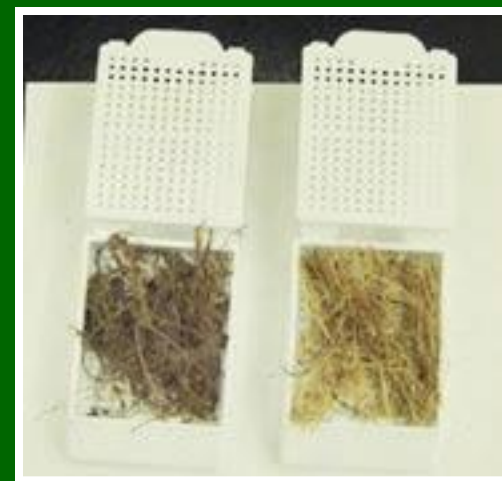


У трав с **мочковатыми корнями** последние берут почти полностью.

У растений со **стержневой корневой системой** собирают лишь самые тонкие корни, толщиной не более 1 мм, потому что именно в них находится микобионт.



фиксаторы:
4% формалин,
70% этанол



Отбор образцов эктомикоризы для анализа

У сеянцев – отбор корневой системы целиком

У взрослых деревьев – отбор корневых образцов из шурфа

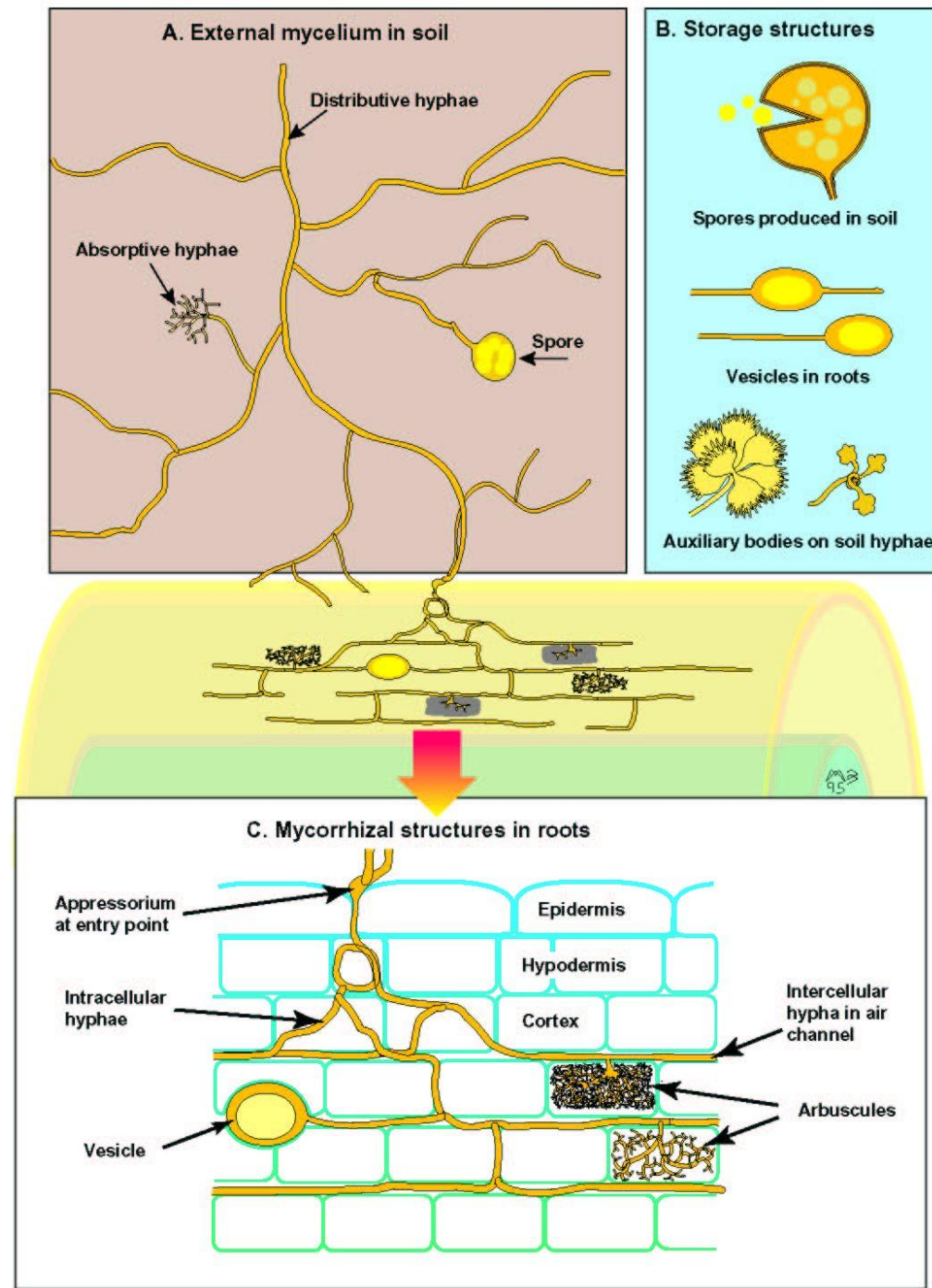
Лопатой, совком или тупым ножом обнажают тончайшие корневые ответвления изучаемого растения, выбирают только свежие активные корневые окончания. Важно убедиться, что взяты корни именно того растения, которое необходимо.

В большинстве случаев максимум развития микориз у древесных растений приходится на **5—20-см слой почвы**, то именно с этой глубины берут корни для изучения микориз. Лишь при специальных исследованиях глубинного распределения микориз образцы берут по всем почвенно-генетическим горизонтам.

Если немедленная обработка невозможна, то проводится фиксация материала **ацетоформолом, хромово-уксусной смесью или жидкостью Карнуа** (по Лобанов, 1971; Селиванов, 1981).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ (АМ)

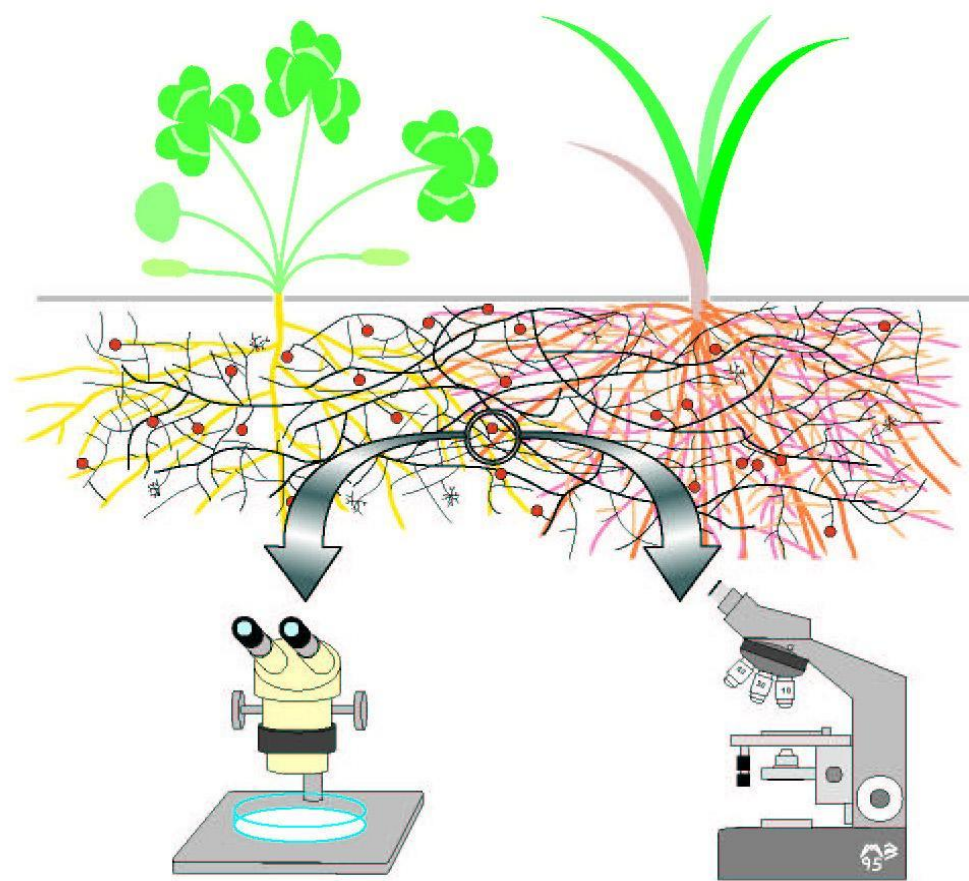
- цитологические
- методы идентификации микобионта (анатомия, молекулярные методы)
- методы количественного учета микориз и микобионтов
- методы исследования физиологии АМ (получение бинарных культур)
- методы получения и применение АМ инокулюма
- методы изучения развития симбиоза (молекулярно-генетические)



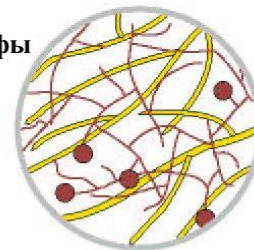
Цитология арбускулярной микоризы

Структуры АМ не видны невооруженным глазом: корневая система не претерпевает морфологических изменений (иногда наблюдается пожелтение или позеленение корней).

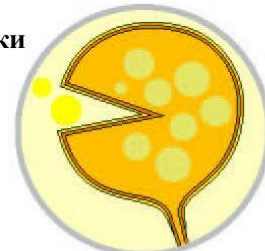
АМ изучают на срезах корней или мацерированном материале.



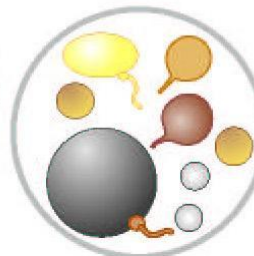
корни
свободные гифы
споры



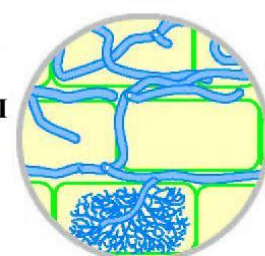
структура стенки
АМ споры



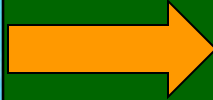
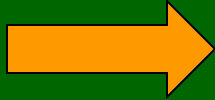
АМ споры
из почвы



структуры АМ
в окрашенном
корне



Цитология арбускулярной микоризы



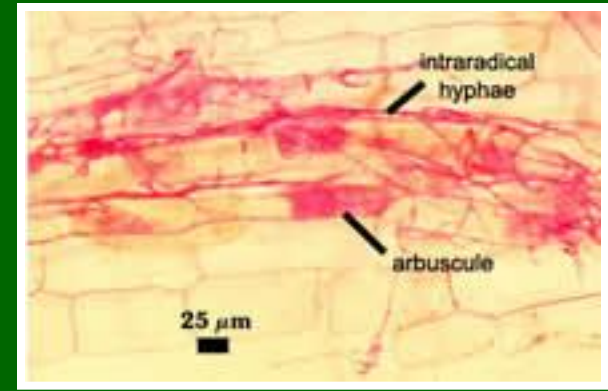
Фрагменты промытых,
очищенных от почвы
корней длиной 2-4 см,
массой – не более 1-2 г.

Осветление корней в 10% р-ре КОН при нагревании (15-20 мин при 121° С в автоклаве или 2-4 часа при 60-90°С на водяной бане) в зависимости от толщины и окраски образцов.

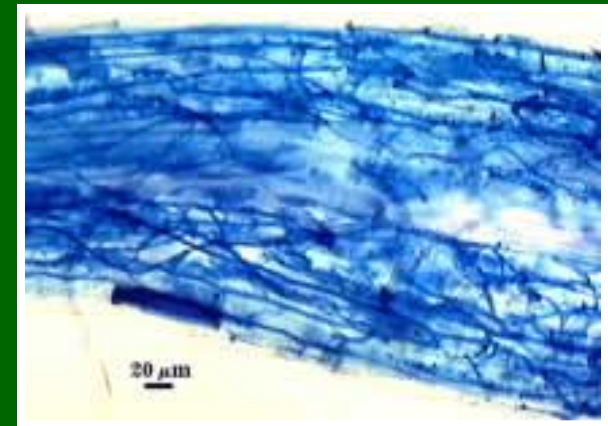
Цитология арбускулярной микоризы



кислый
фуксин



трипан блю



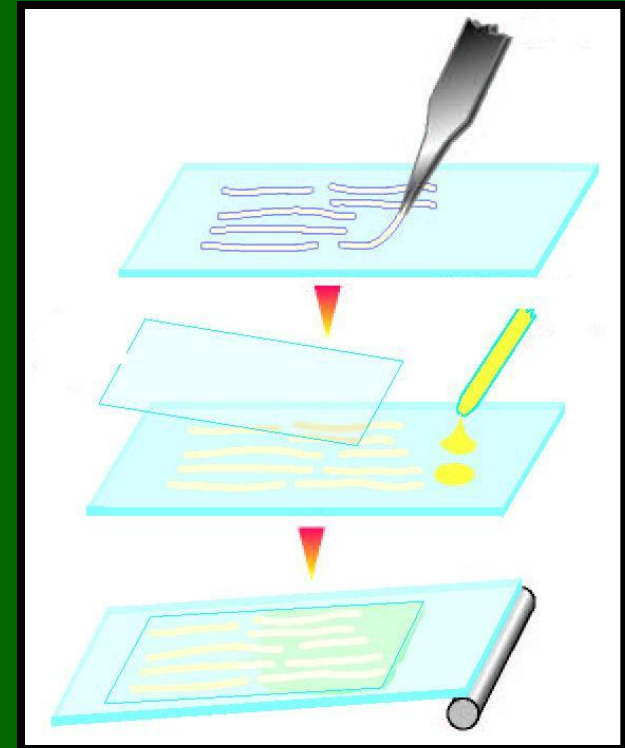
окрашивание

Окрашивание 0,05% р-ром трипан блю в молочной кислоте с глицерином при нагревании (автоклав – 15 мин, водяная баня – несколько часов) или при комнатной температуре – несколько дней. Краситель не рекомендуется для препаратов для фотосъемки.

Цитология арбускулярной микоризы

Прочие красители:

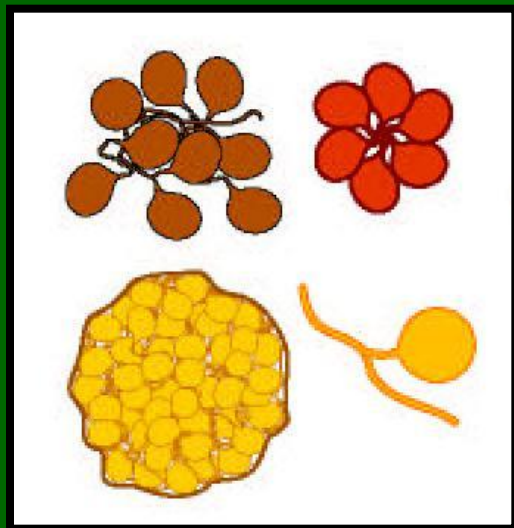
- **Хлоразол черный Е (СВЕ)** – 0,05% р-р в молочной кислоте с глицерином, наиболее широко применяемый краситель на западе. Дает стабильное контрастное окрашивание, корни можно хранить в 50% глицерине.
- **Кислый фуксин и анилиновый синий** - также используются, но контрастность окрашивания ниже и окрашенные препараты быстро обесцвечиваются.
- В отечественной литературе указан в основном раствор **анилинового синего** в молочной кислоте.



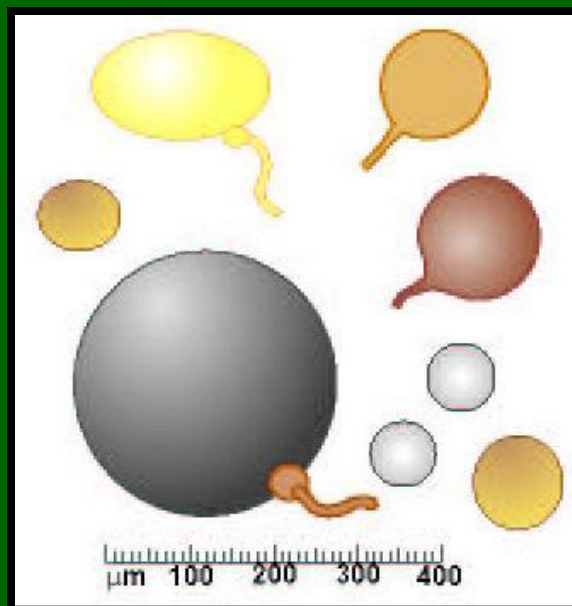
постоянный препарат
матерированных
корней

После окрашивания корни осветляют глицерином.

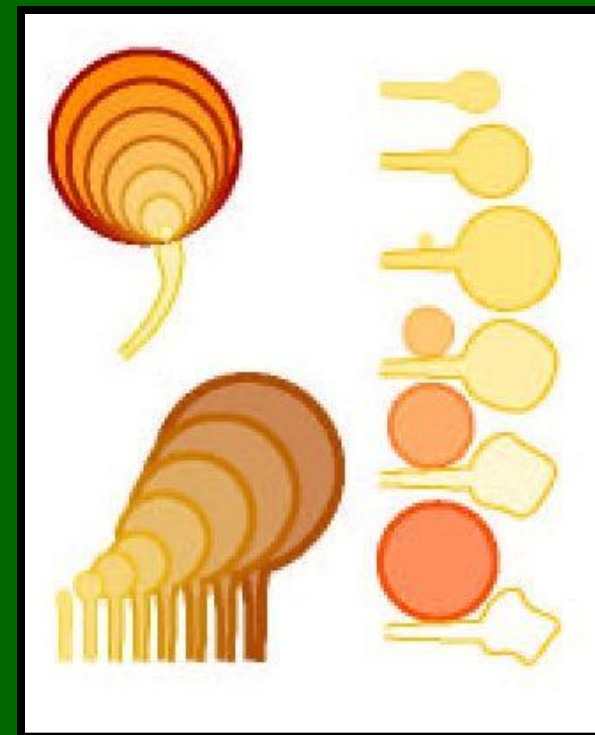
Морфологические особенности спор АМ грибов: идентификация микобионта



Организация спор

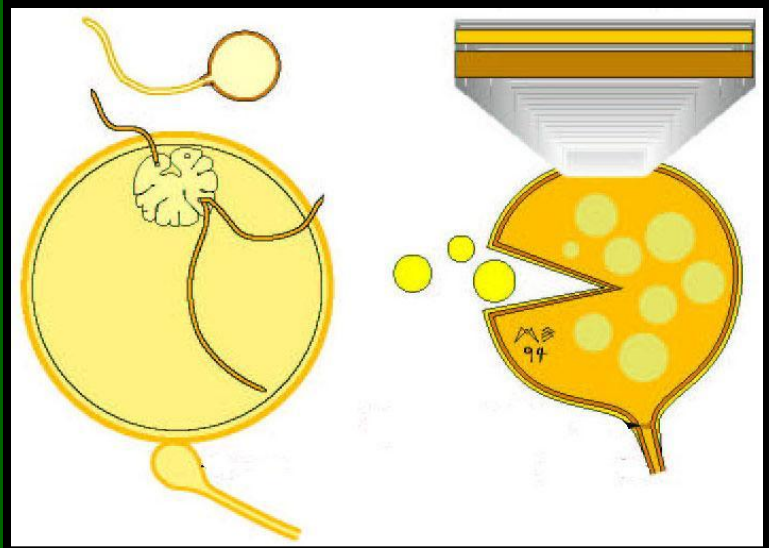


Размеры и форма спор



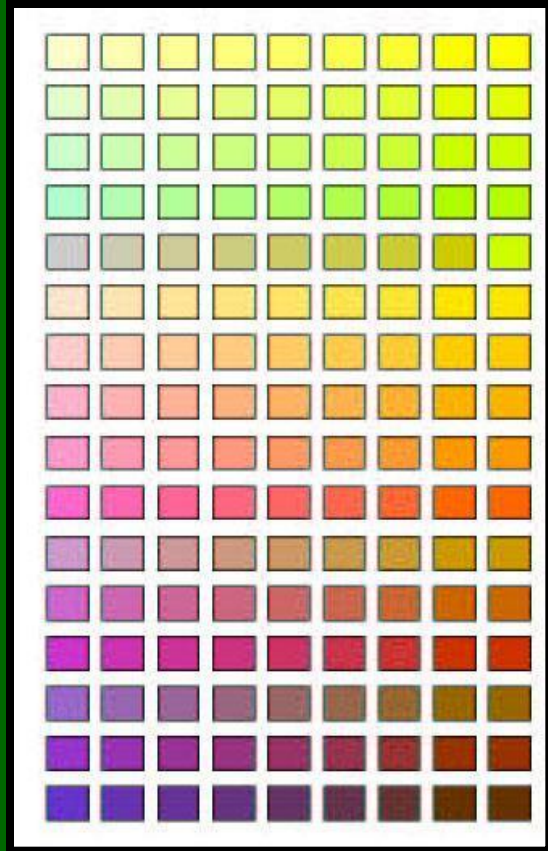
Развитие спор

Морфологические особенности спор АМ грибов: идентификация микобионта

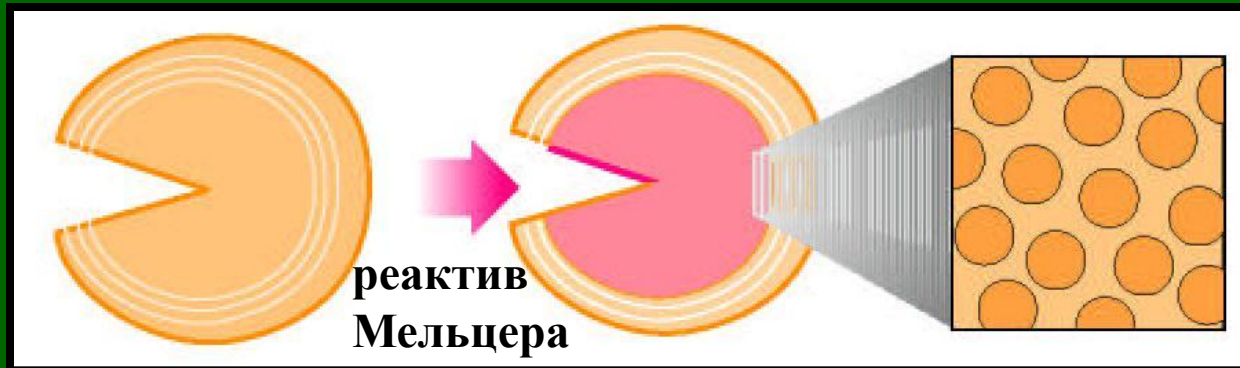


Прорастание спор

Окраска спор

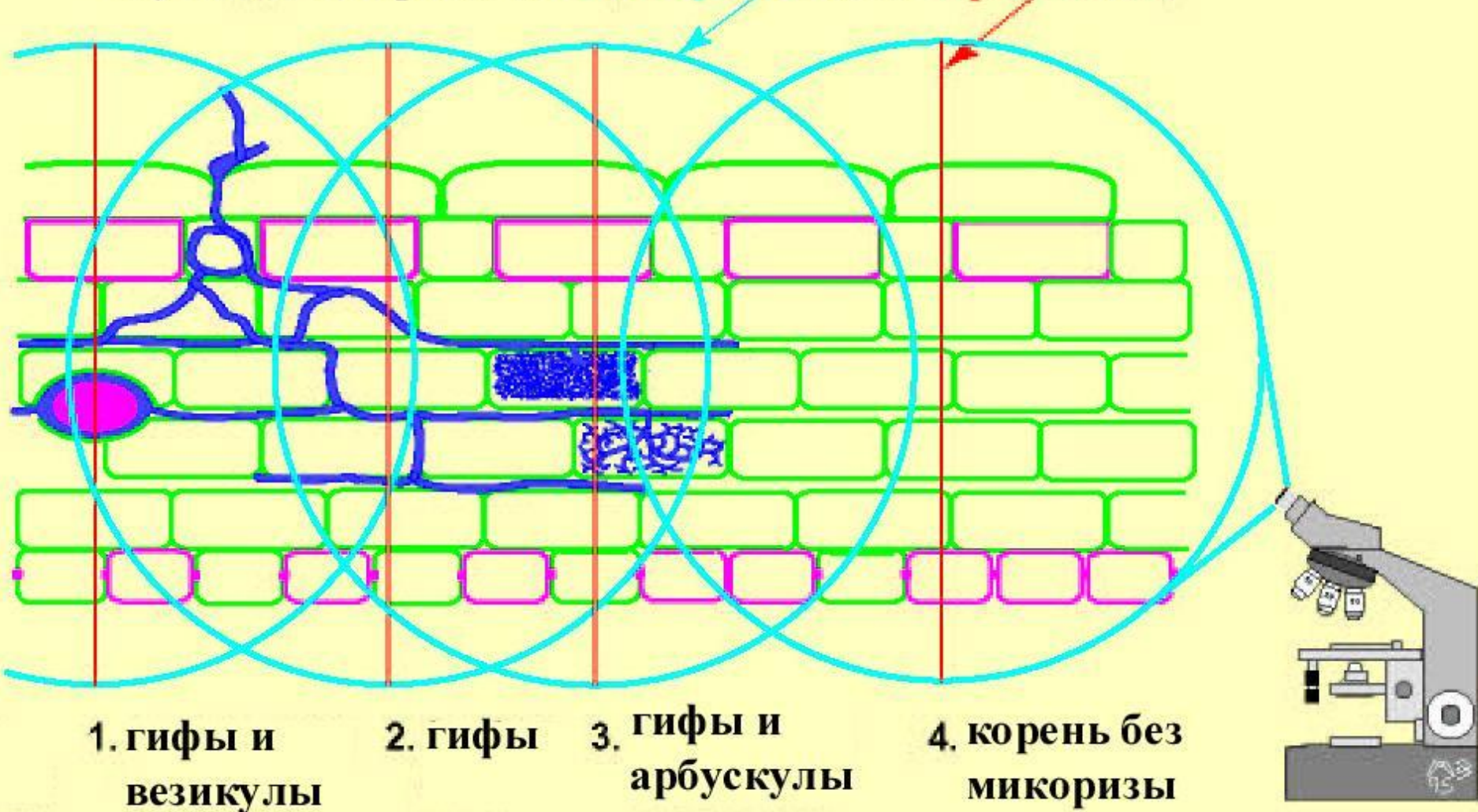


Текстура оболочки спор

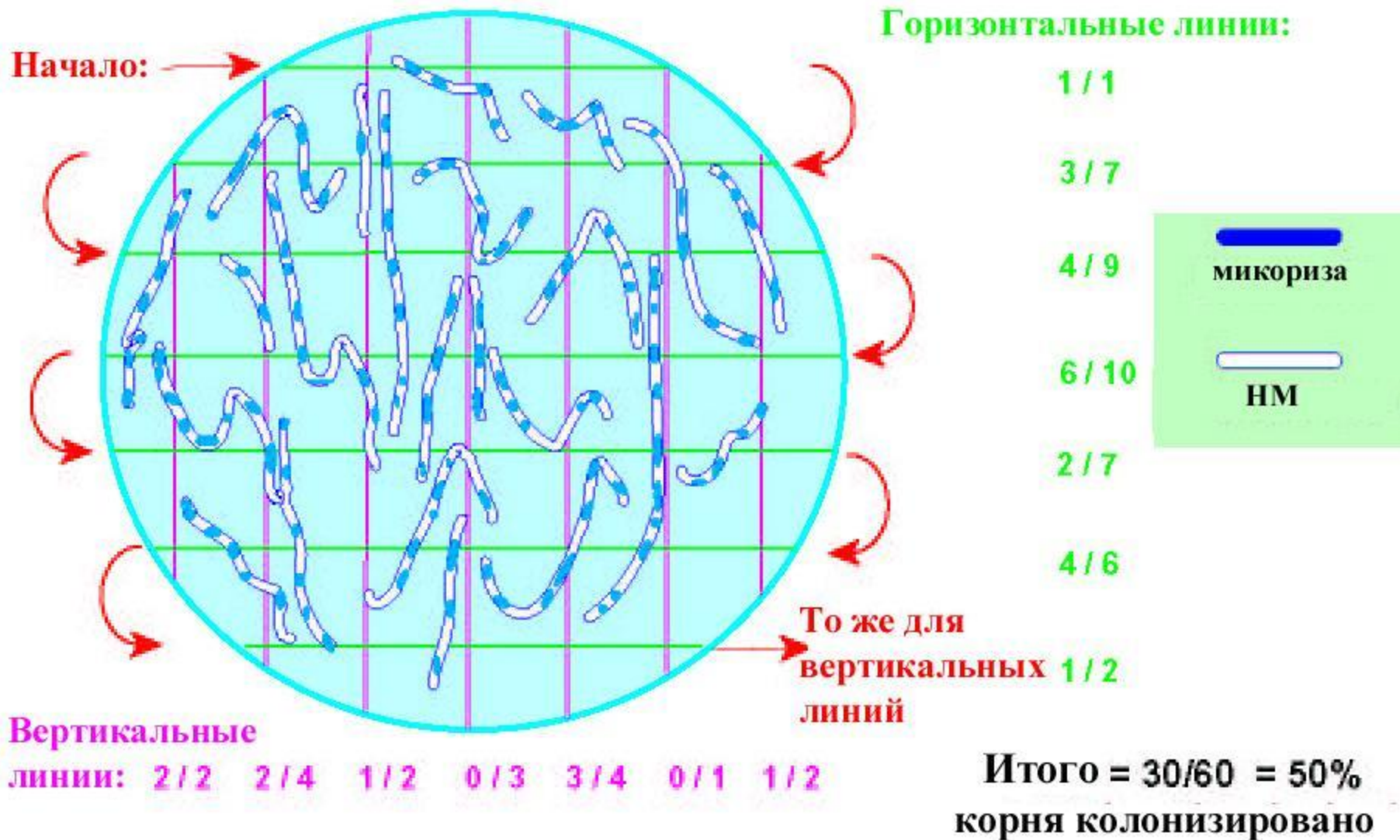


Количественный учет арбускулярной микоризы

случайно выбранные поля зрения или пересечения

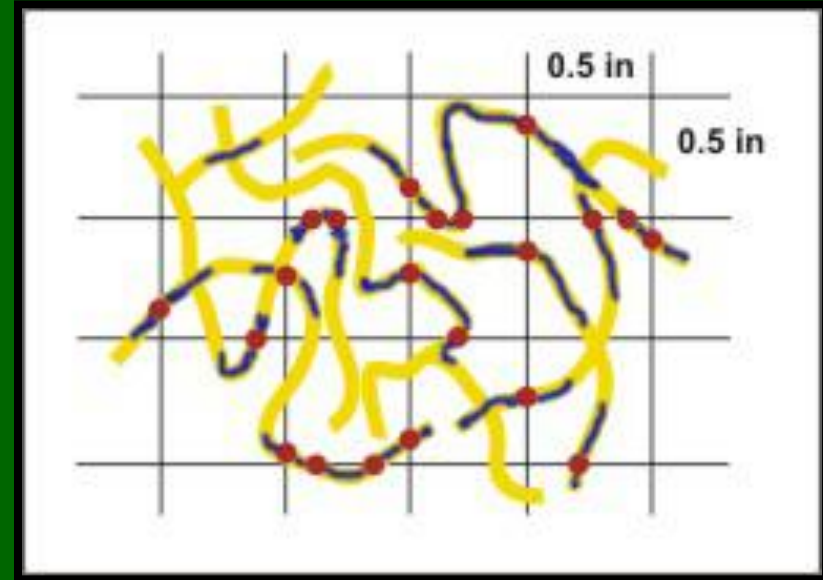


Количественный учет арбускулярной микоризы



Количественный учет арбускулярной микоризы

Корни (не более 0,1 – 0,2 г) раскладывают на чашке Петри с сеткой с размером ячейки 1/2 x 1/2 дюйма и под биноклем считают число пересечений линий и корней (что будет соответствовать общей длине корней – **R1**), а также число таких пересечений, где находилась микоризная часть корня (**R2**). Отношение второй цифры к первой и будет показателем микоризации корней в %.



Определив сырую массу корней в образце, можно после высушивания до постоянного веса определить сухой вес образца. Коэффициент веса, получаемый как отношение сухой массы к влажной, умноженный на полученные по пересечениям с линиями длинам, позволяет вычислить **% микоризации для всего образца.**

Количественный учет арбускулярной микоризы: метод множественного подсчета по Ormsby et al., 2007

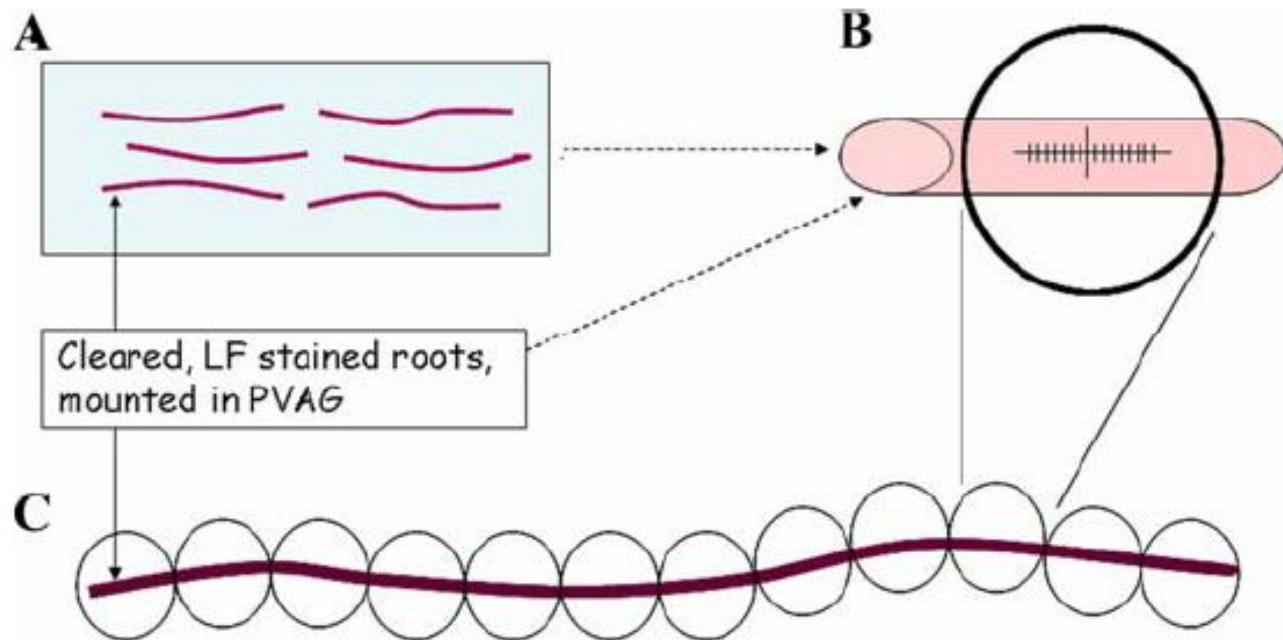


Figure 3. The scanning procedure for the Multiple Quantitation Method. Roots (A) are visualized using at least 200 X magnification (B). Fungal structures that intersect the vertical line on the graticule are considered, throughout the entire focal depth of the root. (C) Intersections are evenly spaced by moving the stage by one field of view each time.

Количественный учет арбускулярной микоризы

Степень микотрофности (M) характеризует обилие гриба в растении.

На каждом исследуемом участке корня (1 см) в пяти полях зрения определяют количество гриба по пятибалльной шкале. Всего просматривают 20 см корня 1-го и 2-го порядков. На основании определения количества гриба на 10 сантиметровых отрезках корня подсчитывают степень микотрофности:

$$M = A/50$$

где A — сумма баллов, выражающая количество гриба на 10 см корня и 50 - число полей зрения на этом же отрезке длины .

Частота встречаемости микориз (F) характеризует соотношение инфицированных и стерильных участков корневой системы.

$$F = n*100/N$$

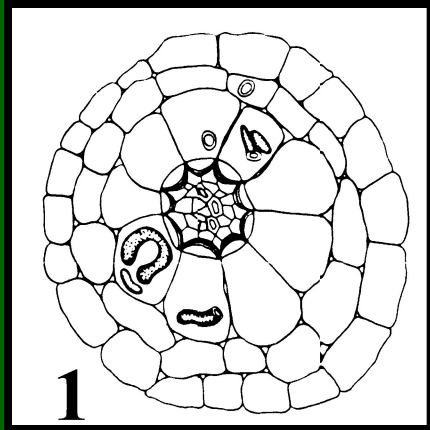
где N — общее число просмотренных полей зрения, n — число полей зрения, где обнаружена микориза.

У каждого растения исследуют не менее 20 см корней 1-го и 2-го порядков и просматривают как минимум по 200 полей зрения.

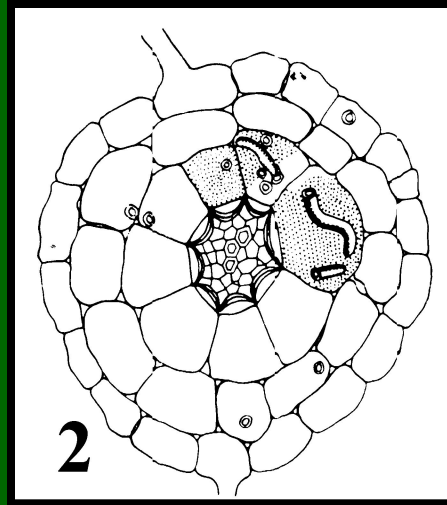
Количественный учет арбускулярной микоризы

Степень микотрофности (М, обилие гриба в корне):

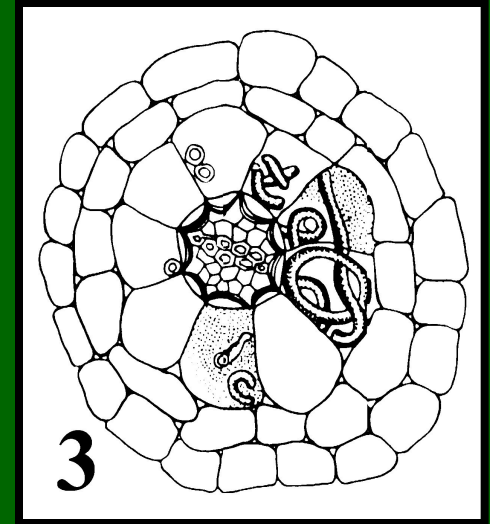
учет в баллах по поперечным срезам



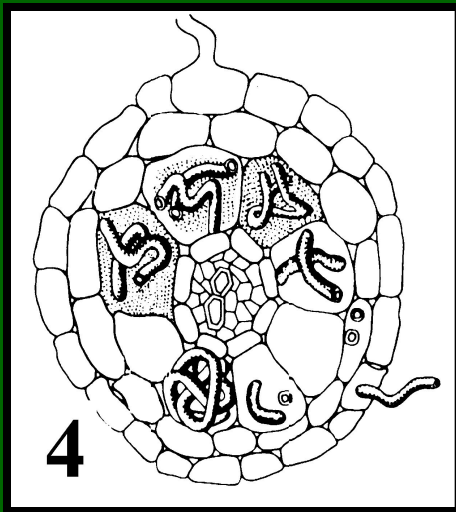
Микобионт в 1-2 клетках.



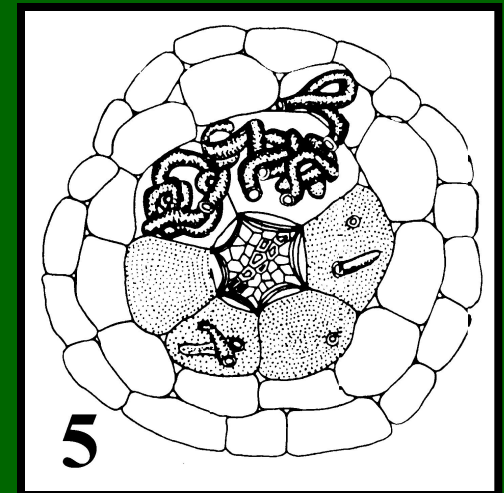
Микобионт в
небольшой
группе клеток



Занято 1/4 - 1/5 мезодермы



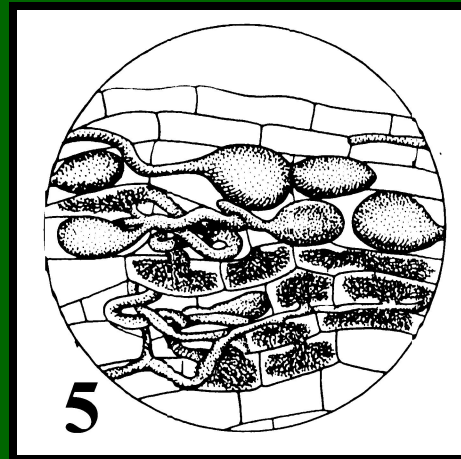
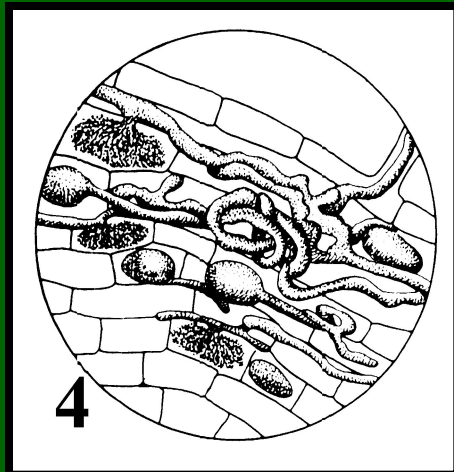
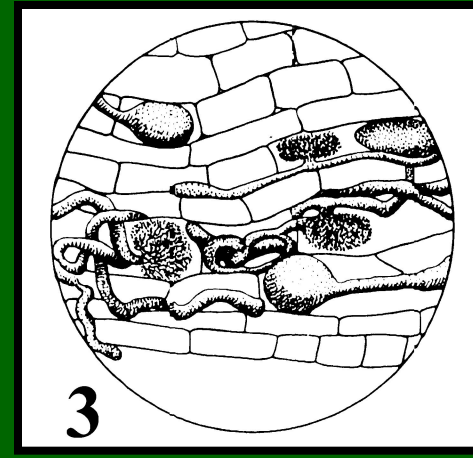
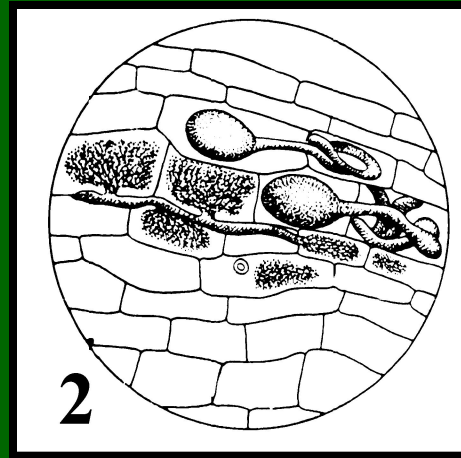
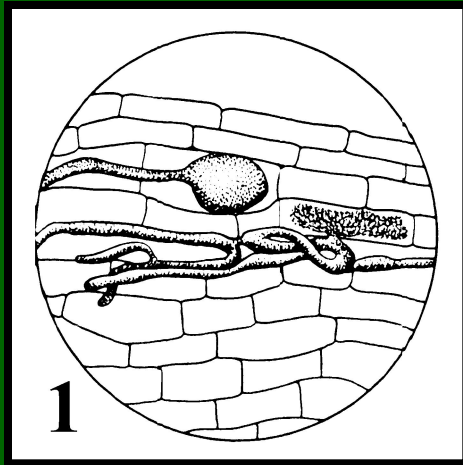
Сплошное кольцо
микобионта вокруг
стелы



Занято не менее 1/3 мезодермы

Количественный учет арбускулярной микоризы

Степень микотрофности (М, обилие гриба в корне): учет в баллах по препаратам мацерированных корней



1. Микобионт в отдельных клетках мезодермы
2. Около 1/4 клеток мезодермы заполнено микобионтом
3. Половина клеток заполнена
4. 3/4 клеток мезодермы заполнены грибом
5. Вся мезодерма занята микобионтом

Количественный учет арбускулярной микоризы

Интенсивность микоризной инфекции (C) характеризует обилие гриба в растении.

$$C = \frac{\sum_{i=1}^5 n_i * i}{N * K}$$

где $\sum_{i=1}^5 n_i * i$ — сумма произведений; n_1 — количество срезов с баллом 1; n_2 — количество срезов с баллом 2; n_3 — количество срезов с баллом 3 и т. д.; N — общее число исследованных срезов (с грибом и без гриба); K — наивысший балл шкалы учета.

Применяется, например, для вычисления среднего значения обилия микобионта по варианту эксперимента или по повторностям.

Методы очистки спор АМ грибов

Споры:

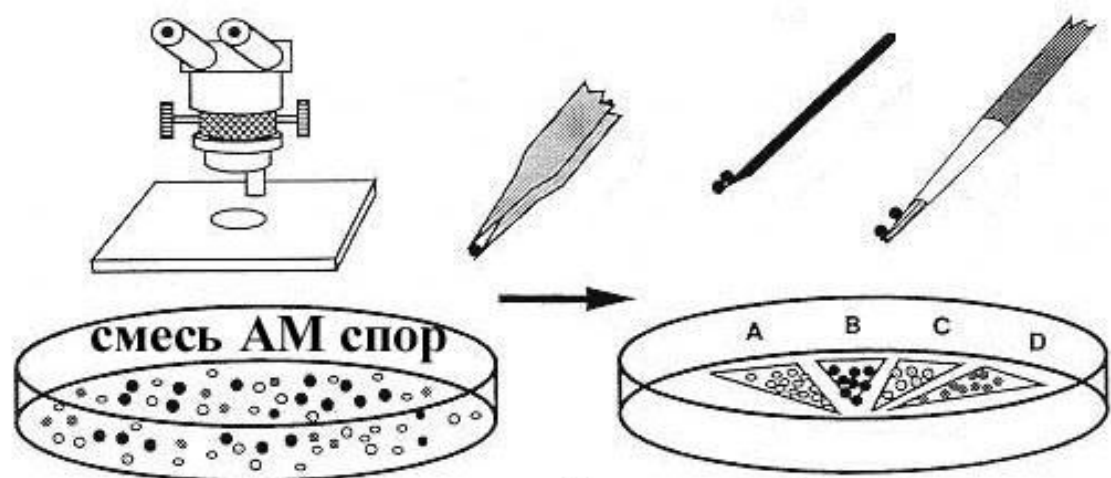
идентификация микобионта АМ

получение инокулюма для экспериментов и производства.

Способы очистки:

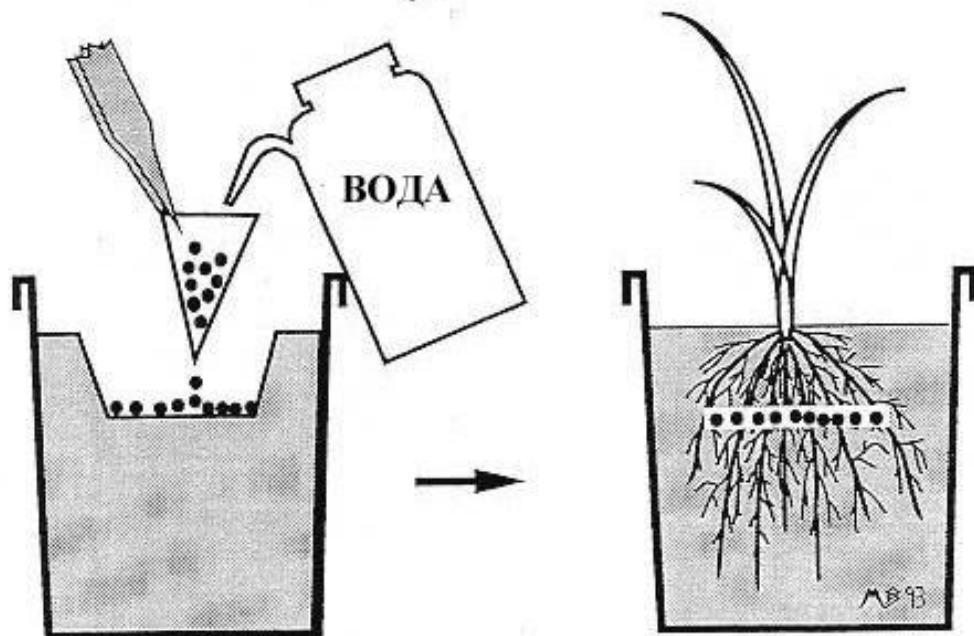
- 1. центрифугирование в градиенте сахарозы** (на дне 50% р-р сахарозы, выше 25% р-р, наверху – вода; споры собираются в зоне 25% сахарозы).
- 2. разделительное осаждение в желатиновых колонках** (на дне застывший 20% желатин, выше 15% желатин, над ним 5%, наверху вода; нагревают на водной бане, через 30 мин охлаждают, споры скапливаются на стыке 5 и 15% желатина. Сегмент колонки вырезают, осторожно растапливают и отфильтровывают).
- 3. метод флотации** (тонкую органическую фракцию помещают в колонку с 50%-ным глицерином и снизу продувают сжатым воздухом через перфорированный диск).
- 4. центрифугирование в градиенте плотности контрастного вещества** (то, что используется при рентгене. Градиент – 60, 40, 20 и 10%).

ПОЛУЧЕНИЕ БИНАРНОЙ ГОРШЕЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ИЗ СПОР

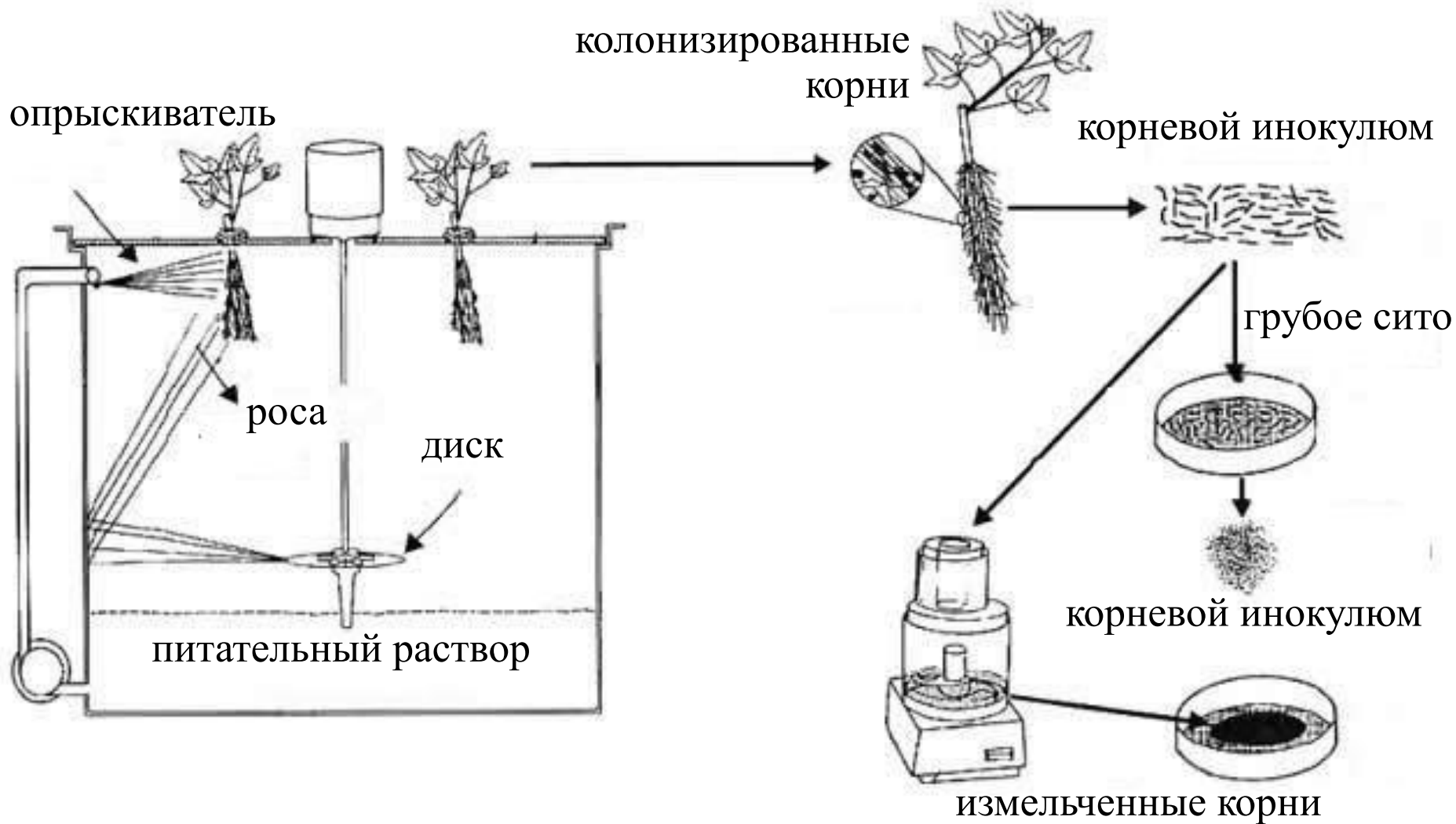


Споры, просеянные из почвы, отбирают под бинокуляром тонким пинцетом или кистью и помещают на треугольники из фильтровальной бумаги.

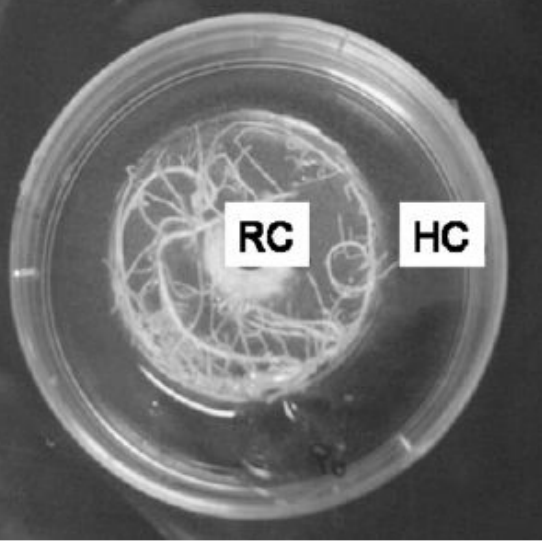
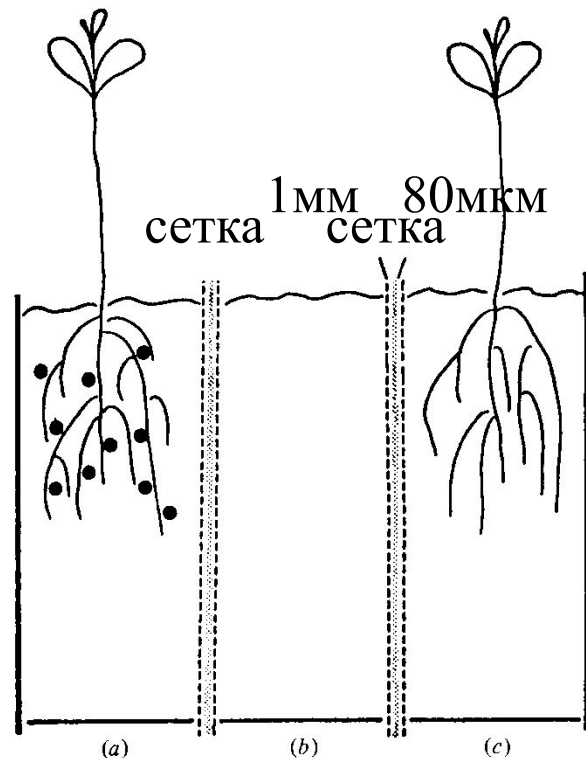
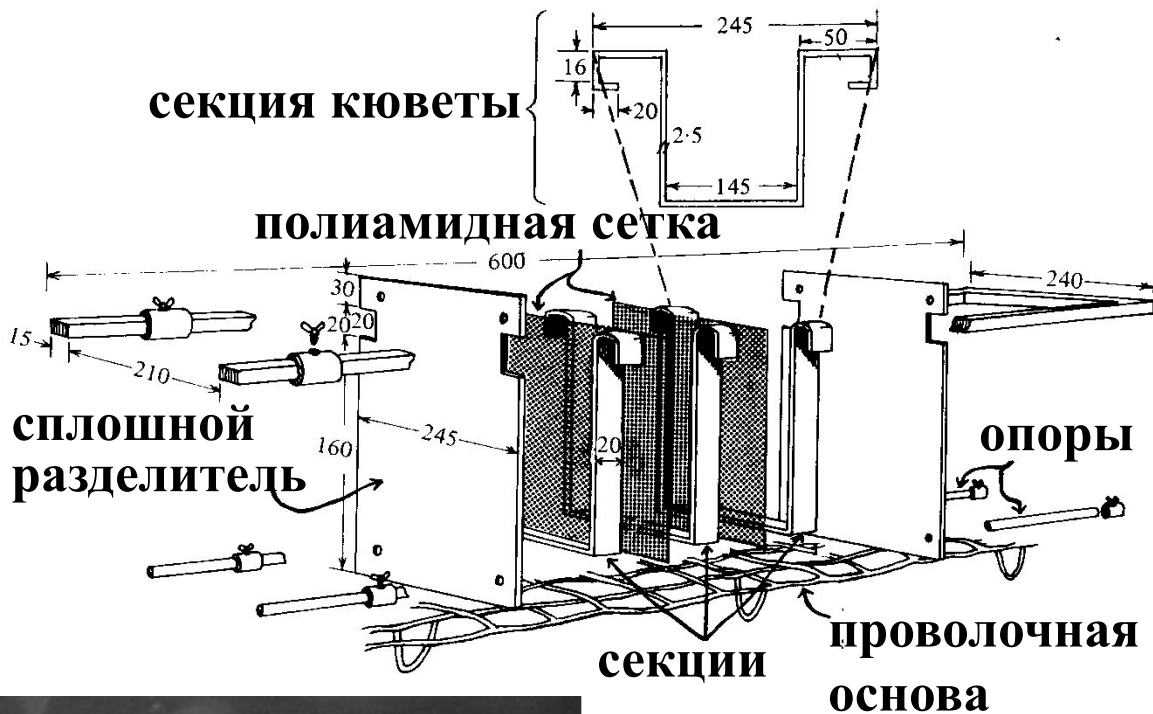
Споры одного типа смывают в горшок с пропаренным песком, где будет расти растение-хозяин.



Получение инокулюма АМ гриба



Кювета для исследования физиологии АМ и микоризации растений



- (a) – отсек с микоризным растением
- (b) – отсек для внесения субстрата
- (c) – отсек с растением-реципиентом

Постановка эксперимента для изучения транспорта углерода в микоризной сети (AM)

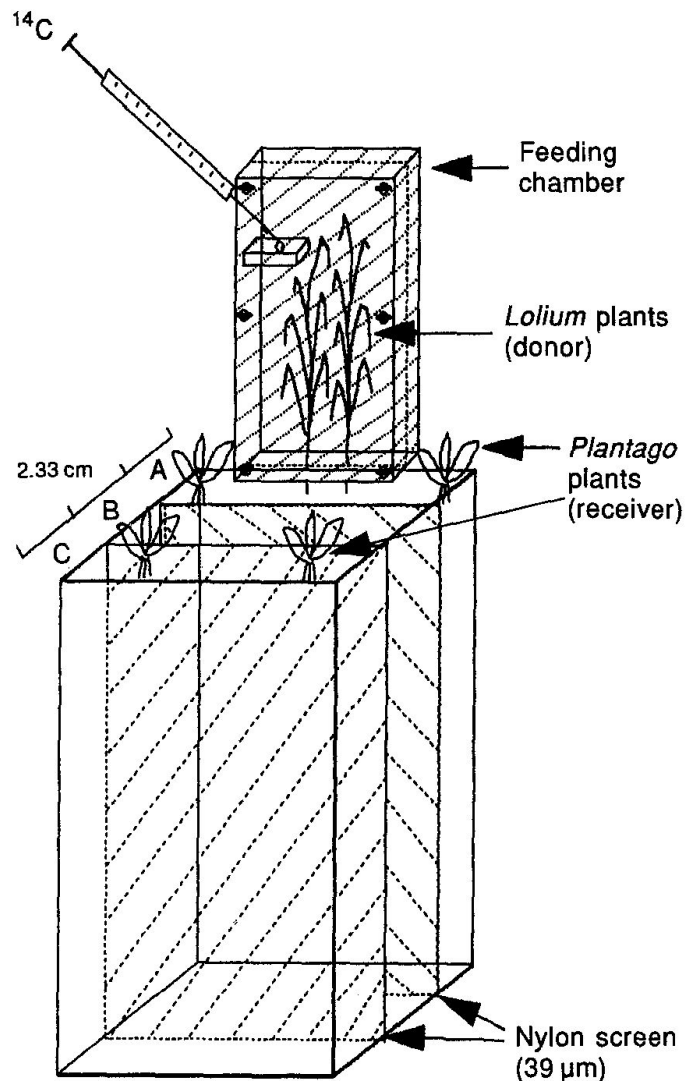
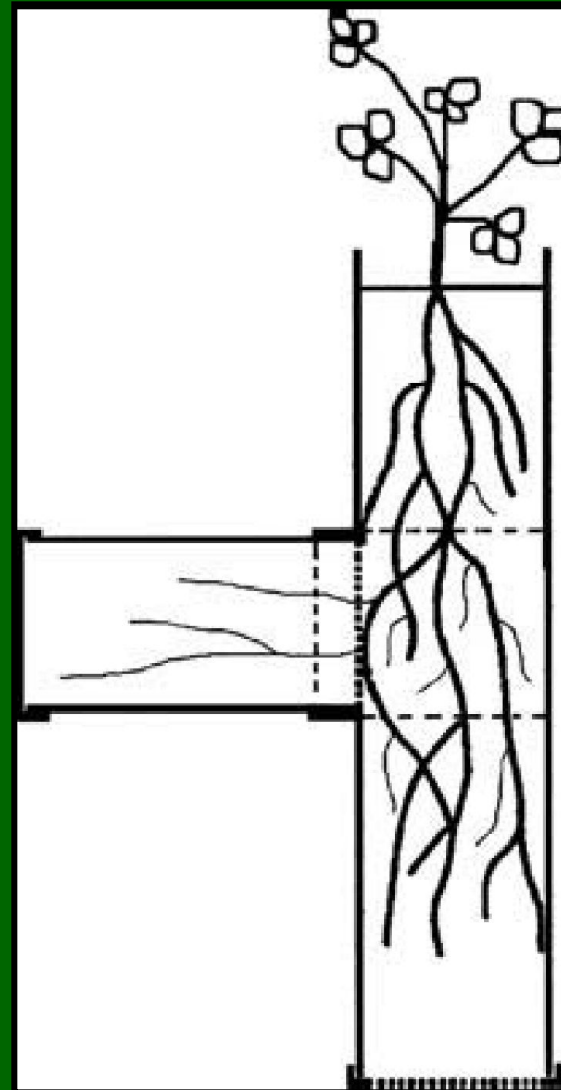


Fig. 1. Design of the pots, showing the feeding of ^{14}C

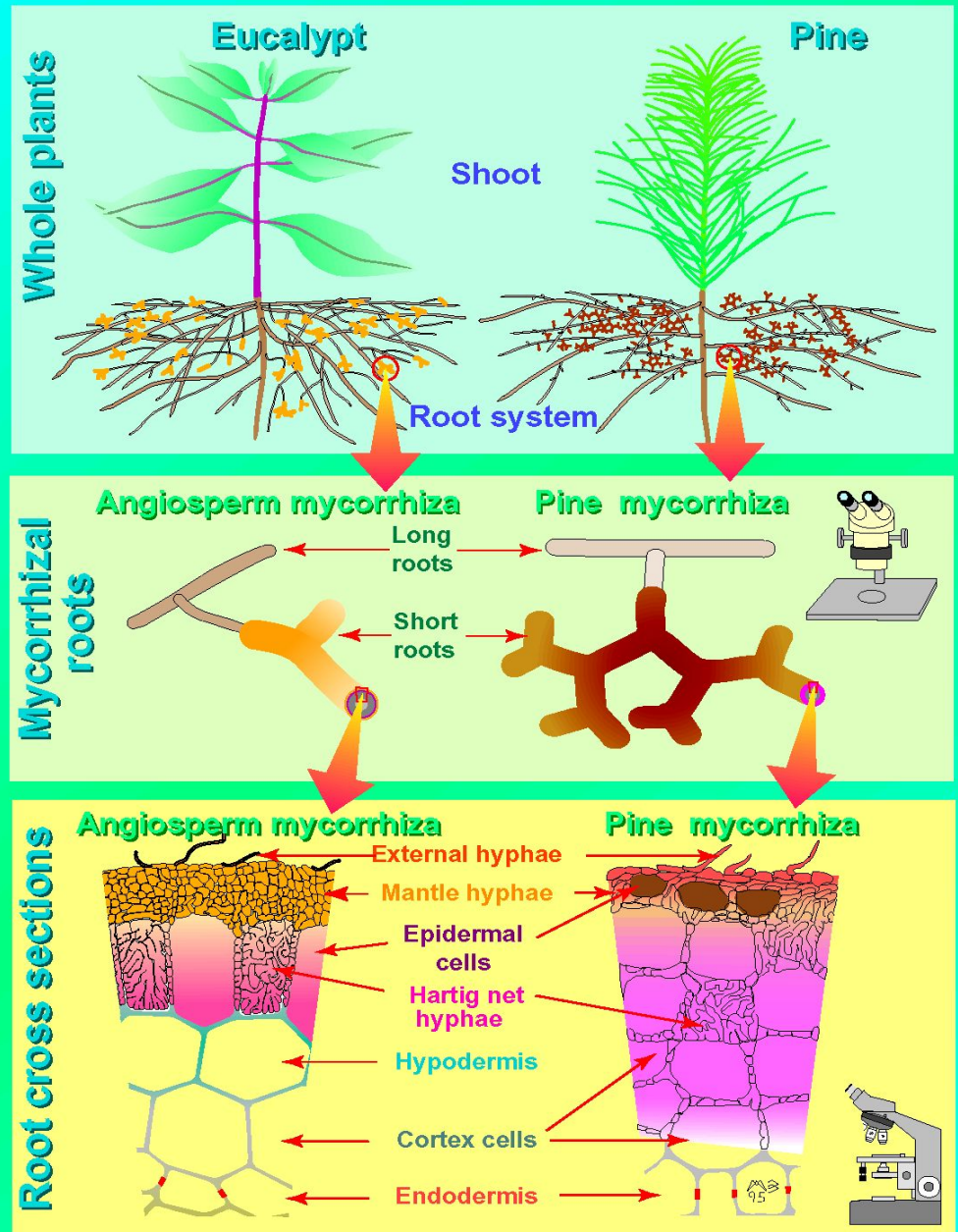


«Крестообразный горшок», проникновение корней в гифальный отсек предотвращается сеткой для изучения влияния свободного мицелия на поглощение растениями питательных веществ

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКТОМИКОРИЗЫ

- изучение морфологии и цитологии
- методы идентификации микобионта (морфотипирование, молекулярные методы)
- методы количественного учета
- картирование
- изотопные методы (физиология)
- работа с чистыми культурами (физиология)
- синтез микоризы *in vitro* и в микрокосмах
- молекулярный анализ структуры ЭМ сообщества

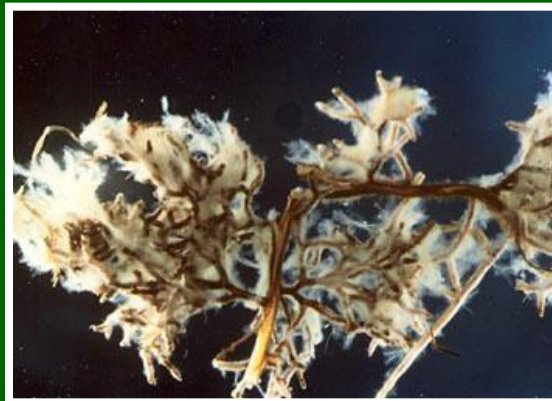
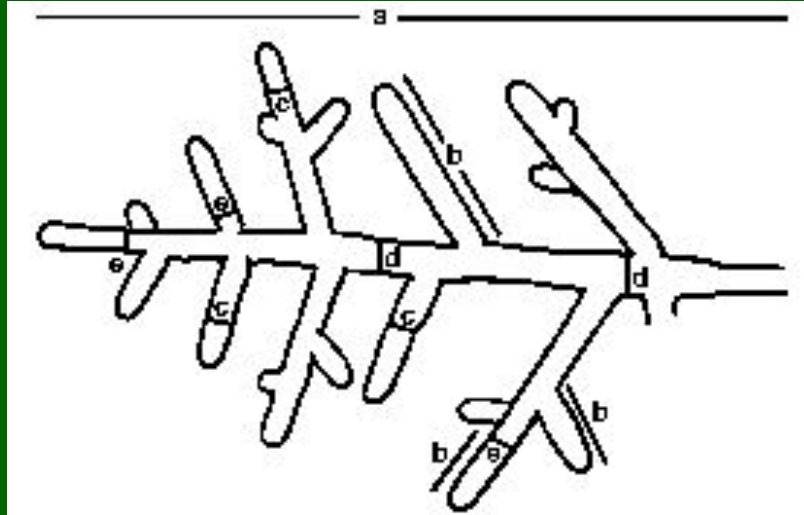
ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATIONS



Морфология эктомикоризы

Признаки микоризного окончания:

- тип ветвления
- форма
- размеры
- окраска
- текстура
- блеск
- морфология экстраматричных гиф
- наличие ризоморф



Морфология эктомикоризы

DEEMY – System for characterization and Determination of EctoMYcorrhizae (Agerer, Rambold, 1996)

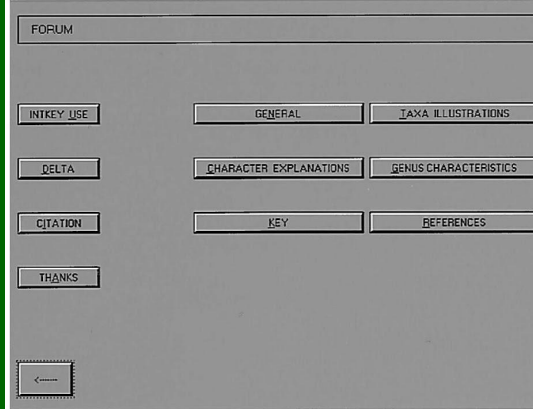


Fig. 1

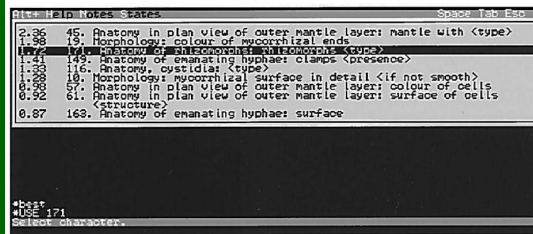


Fig. 3

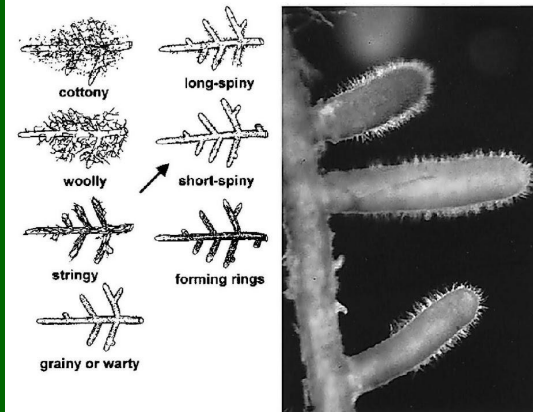


Fig. 5

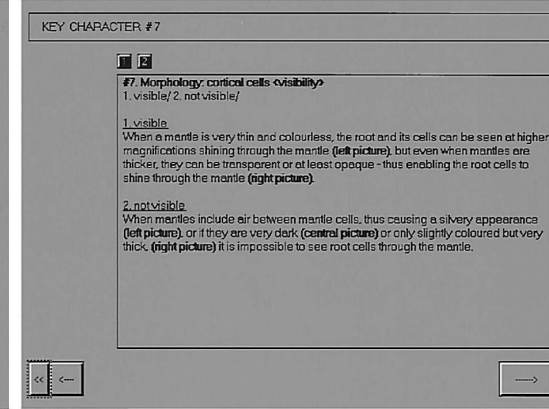


Fig. 2

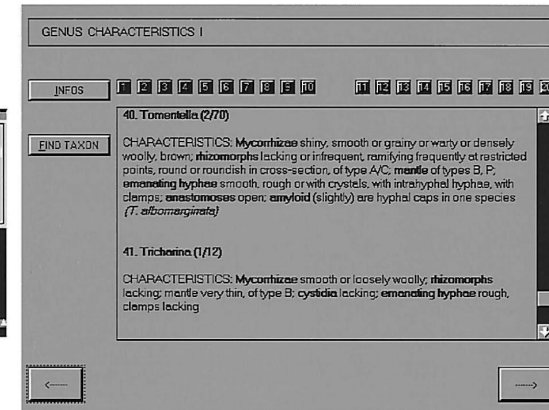


Fig. 4

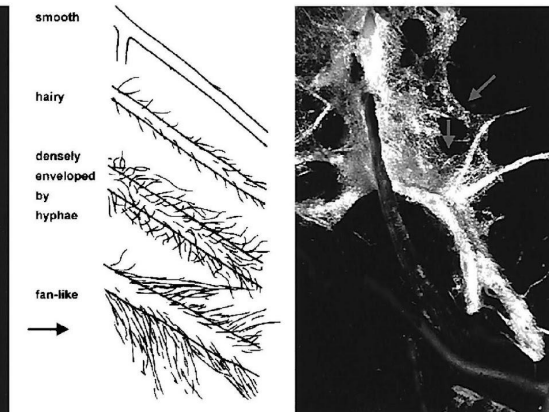


Fig. 6

Базы данных в
Интернете:
[http://www.deemy.de/
Descriptors/Headings](http://www.deemy.de/Descriptors/Headings)
[http://dde.forrex.org/
biodiversity/ecto/
glossary/identification_e.html](http://dde.forrex.org/biodiversity/ecto/glossary/identification_e.html)

Цитология эктомикоризы

фиксаторы:

- **р-р Джуэля** (2%-ная хромовая к-та – 25 мл, 10%-ный хлорид платины - 2,5 мл, ледяная уксусная к-та - 1мл , дист. вода - 75 мл)

метод Лобанова для фиксации микоризы дуба и сосны:

ацетоформол (50%-ный этанол - 100мл , ледяная уксусная к-та - 7мл , 40%-ный формалин - 7 мл)

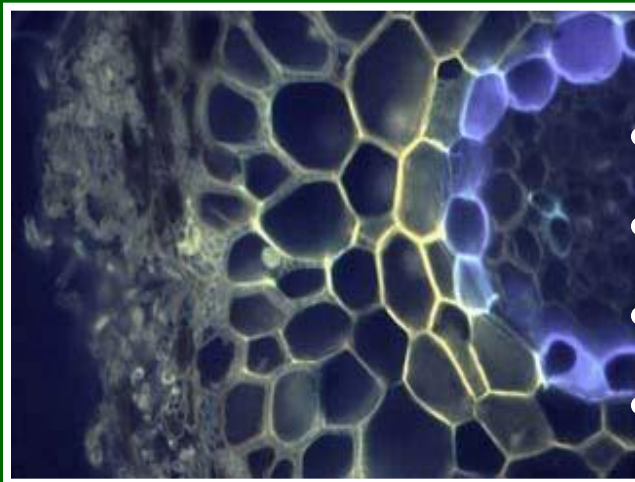
- **хромово-уксуснокислый р-р** (хромовый ангидрид - 7 г , ледяная уксусная к-та - 3 г, дист. вода - 100 мл)

красители:

- **толуидиновый синий** – интенсивное окрашивание в синий цвет ядер гриба и клеток корня и в голубой цвет – оболочки и плазмы мицелия; для микоризы березы и дуба
- **по Иоллесу** (*сафранин – лихтгрюн*) – кл. стенки гиф и плазма гриба окрашиваются в зеленый тон; контуры клеток корня окрашиваются менее интенсивно; ядра – в оттенки красного. Рекомендуется для лиственных и хвойных после любых фиксаторов, в т.ч спирта

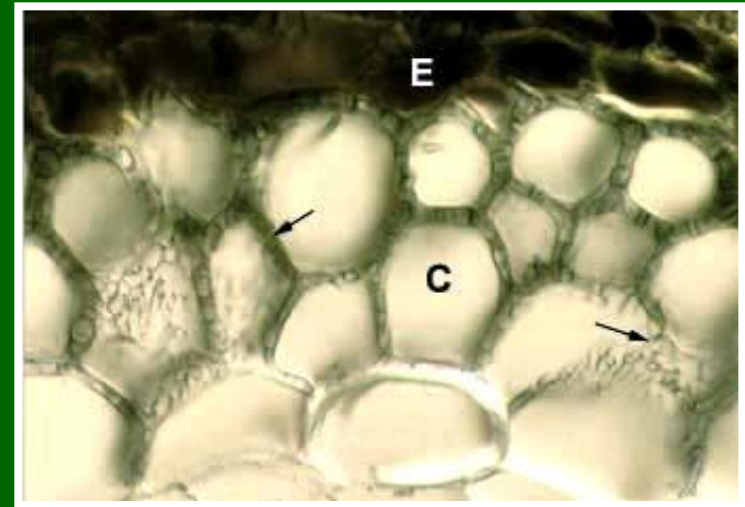
ЦИТОЛОГИЯ ЭКТОМИКОРИЗЫ

- **по Фельгену** – ядра и клетки корня окрашиваются в красный, а оболочка клеток гриба – в розовый цвет; для микориз хвойных.
- **хлоразол черный** (Chlorazol black E, Direct black 38 C.I. No. 30235)
- **метиленовый синий**, **метиленовый зеленый** и др. Все окраски для постоянных препаратов в канадском бальзаме.
- **флуоресцентные** красители
- **фазово-контрастная** и **электронная** микроскопия



структуры:

- сеть Гартига
- чехол
- цистиды
- строение гиф



Количественный учет эктомикориз

У сеянцев: измерение корневой системы целиком;
отношение длин микоризованной части к общей –
МИКОРИЗАЦИЯ (%).

Методом пересечения ячеек: измерения под бинокуляром
фрагментированных корней.

Для получения более четкой картины корни просветляют
10% водным КОН и окрашивают.

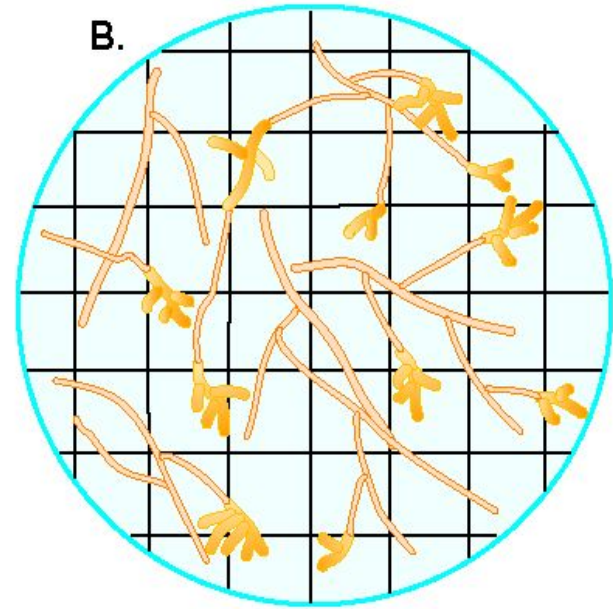
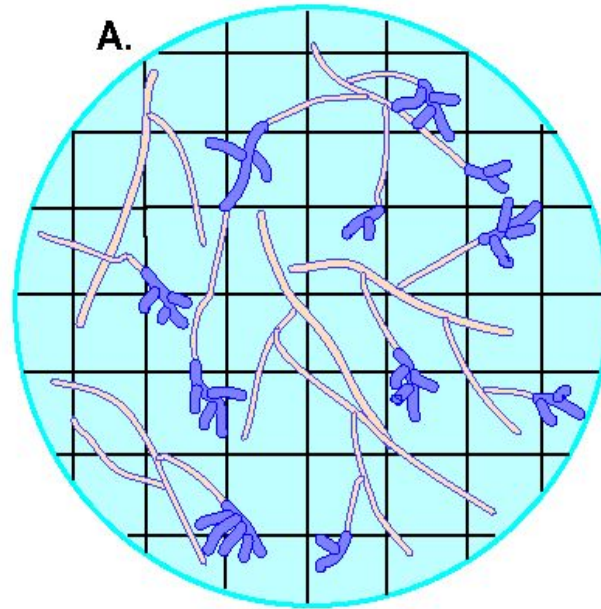
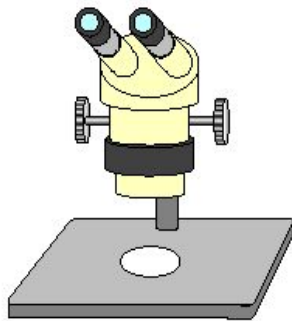
Биомассу **экстраматрического мицелия** оценивают по
количеству маркеров – хитина, эргостерола, специфических
жирных кислот (PLFA 18 : 2 ω 6,9).

НО: специфичными только для ЭМ мицелиев эти вещества
не являются.

Количественный учет эктомикориз

A. Using the gridline intersection method to count ECM roots

1. Measure root length of stained (A) or unstained (B) roots with a dissecting microscope using the gridline intersect method



2. Count the length of mycorrhizal roots or the number of mycorrhizal root tips



Results: 65 = Root length (cm)
24 = Mycorrhizal root length (cm)
36 = Mycorrhizal root tips

Количественный учет микоризы в фитоценозе

Количественные характеристики микотрофизма, или доли участия немикотрофных и в разной степени микотрофных растений в фитоценозе:

- 1) частота встречаемости микотрофных видов в растительном сообществе, в процентах к числу исследованных растений в фитоценозе (V);
- 2) средняя интенсивность микоризной инфекции, или коэффициент интенсивности микоризной инфекции (Q);

$$Q = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{n} * 100$$

где $\sum_{i=1}^n C_i$

сумма значений интенсивности микоризной инфекции у микотрофных ценобионтов; n — число видов в фитоценозе, у которых обнаружена микориза.

Количественный учет микоризы в фитоценозе

3) относительная интенсивность микоризной инфекции, или микосимбиотический коэффициент фитоценоза (M);

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{N} * 100$$

где N — общее количество исследованных видов в фитоценозе

$$\sum_{i=1}^n C_i$$

—сумма значений, выражающих интенсивность микоризной инфекции у отдельных микоризных видов фитоценоза.

4) микосимбиотический ряд дифференциации (W).

дает представление о соотношении между немикотрофными, слабо-, средне- и высокомикотрофными растениями (в процентах к общему числу видов растительного сообщества).

Методы идентификации микобионтов микориз

1. Наблюдение распределения ПТ в лесах
2. Прослеживание гиф от ПТ к микоризе
3. Идентификация чистых культур микоризообразователей
4. Синтез микориз культурой известного гриба
5. Идентификация ЭМ грибов по микоризам
6. Данные анализа ДНК

Трудности идентификации микобионта ЭМ:

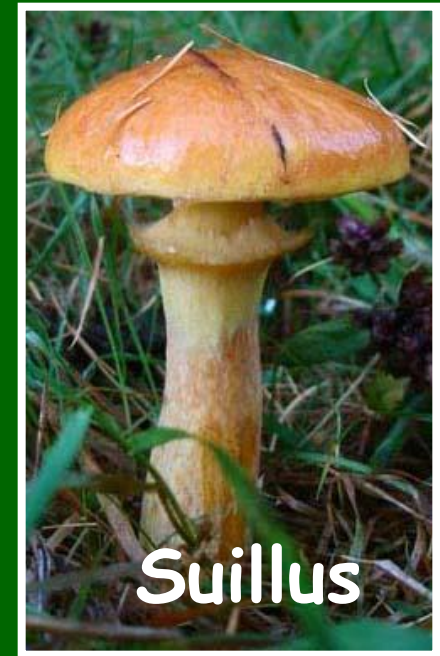
- Выделение морфотипов микоризных окончаний и создание описаний и определителей – проблема до сих пор не решена

- Мицелий микоризообразователей нефизиономичен и не обладает признаками, отличающими его от мицелия грибов других эколого-трофических групп

- Микобионты почти не растут в культуре на питательных средах (кроме видов *Suillus*, *Laccaria*)

- Синтез микоризы трудоемок

- Обнаружение плодовых тел вблизи корневой системы дает только приблизительное представление о симбиозе



Методы изучения микоризообразующих грибов



Lactarius



Pisolithus

1. Наблюдение за плодовыми телами
2. Культуральные исследования мицелия
3. Молекулярные техники анализа ЭМ сообществ

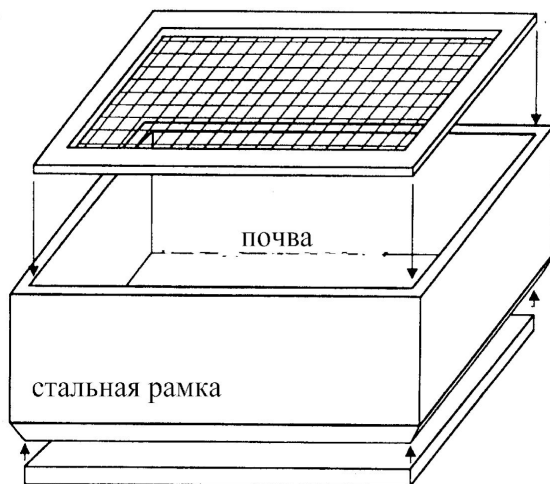


Tomentella

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСТРЕДЕЛЕНИЕ МИКОРИЗ И ЭМ ГРИБОВ: КАРТИРОВАНИЕ

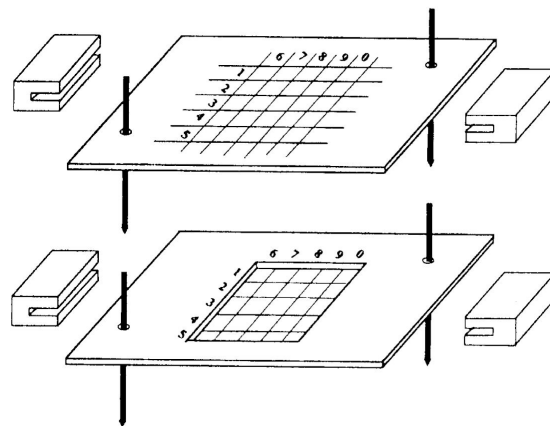
- КАРТИРОВАНИЕ КОЛОНИЙ ЭМ ГРИБОВ
- МИКРОКАРТИРОВАНИЕ (McMr) ЭКТОМИКОРИЗ (Agerer, 2002)

рамка с нейлоновой сеткой (ячейка 10 мм)
для фиксации корней и ЭМ
в первоначальном положении



плексигласовый поддон
для удерживания почвы

Оборудование для учета эктомикориз

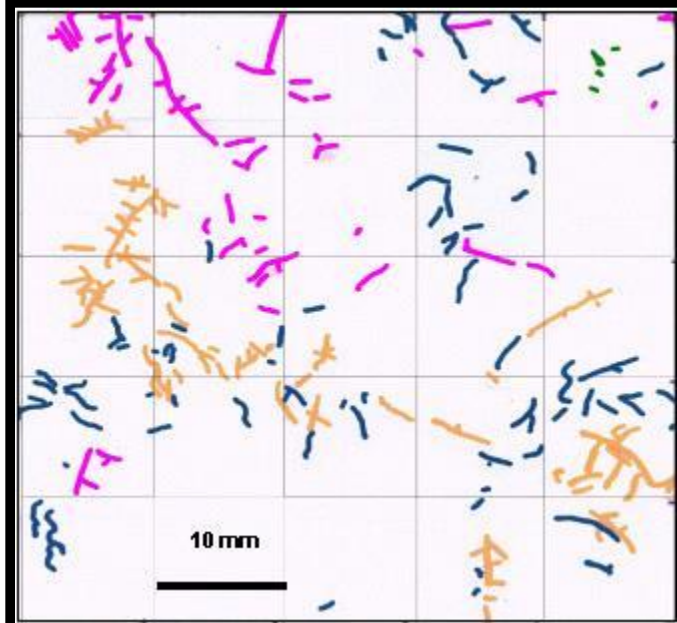


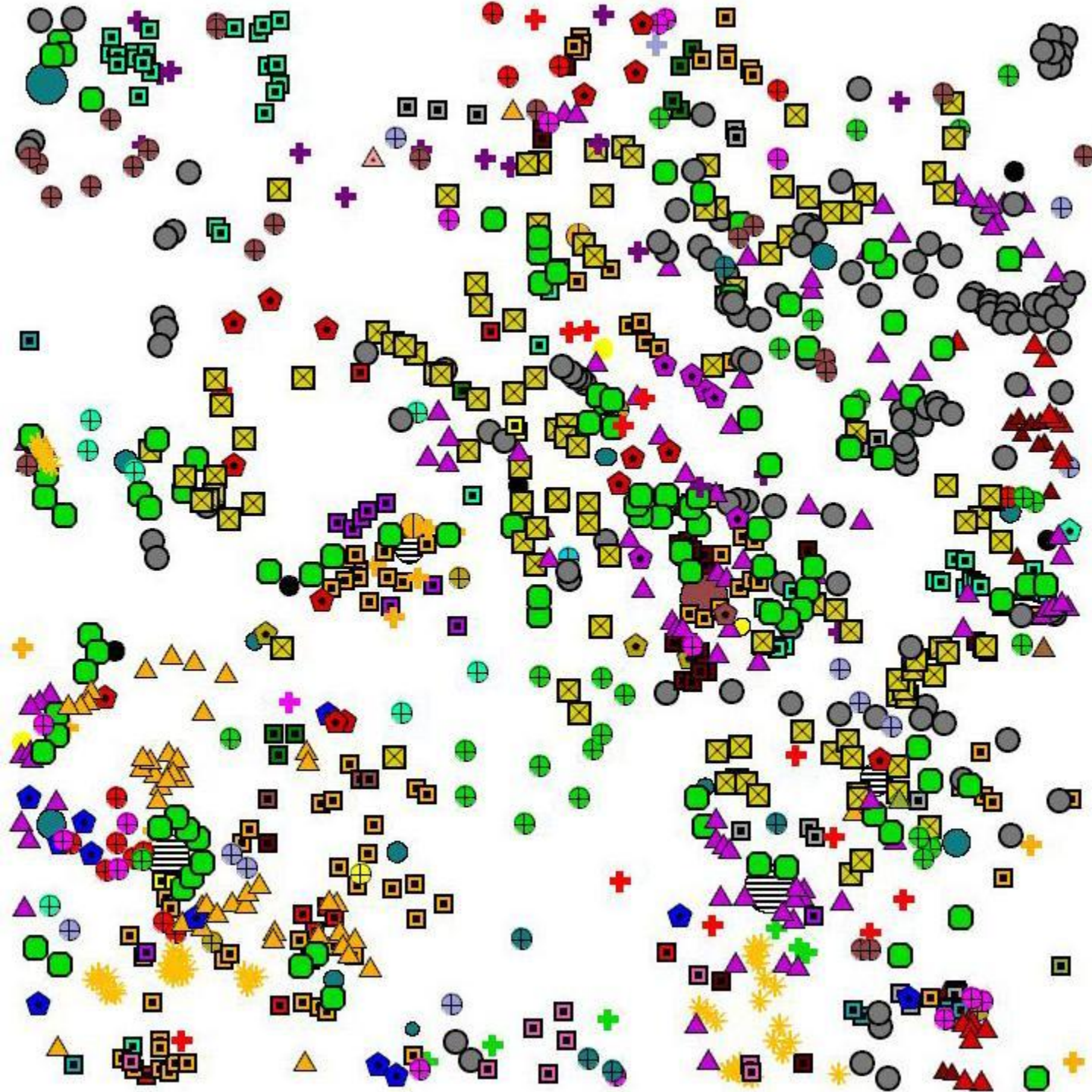
сверху: плексигласовая пластина с
выгравированной сеткой (10 мм) -McMr,
с 2 отверстиями для закрепления на почве
с помощью стальных стержней и
утяжелители, закрепляемые по краям пластины

снизу: плексигласовая рамка с
нейлоновой сеткой (10 мм),
которой заменяют McMr для
сбора эктомикориз

Сетку McMr и рамки располагают
на поверхности почвы в одинаковом
положении, закрепляя стержнями и
утяжелителями.

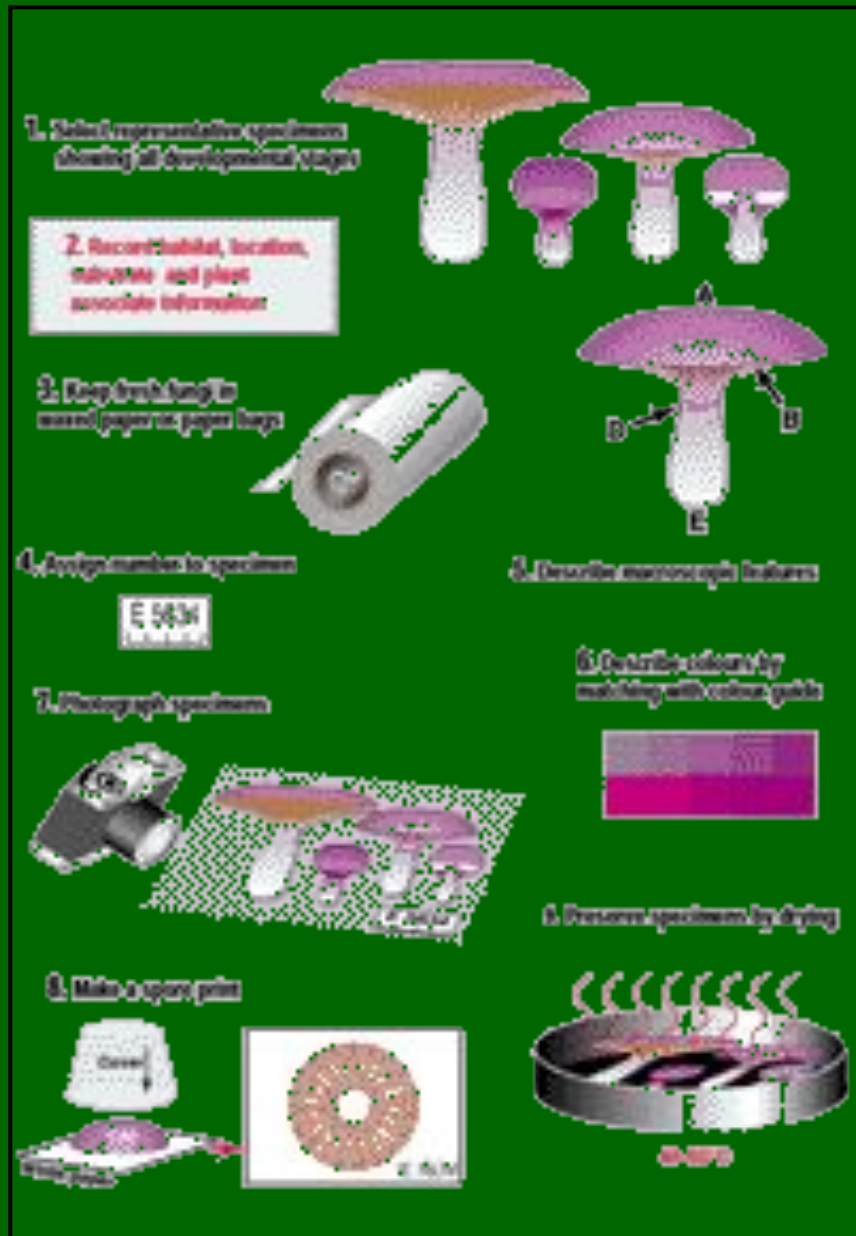
Оборудование для отбора микоризных окончаний





Пространственное
распределение
ЭМ
грибов:
картирование
ПТ

Чистые культуры эктомикоризных грибов



Выделение культуры:
из плодовых тел
из ризоморф
из микоризных окончаний

Дезинфицирующие р-ры:

100 мг сулемы на 1 л воды –
обрабатывают 2-3 мин; 30%-ная
перекись водорода – 5-20 сек.

Чистые культуры эктомикоризных грибов

Среды для выделения и культивирования:

модифицированная

среда Мелина –

Норкранса (MMN)

CaCl₂ 0,05 г

NaCl 0,025 г

KH₂PO₄ 0,5г.

(NH₄)₂ PO₄ 0,25г.

MgSO₄*7H₂O 0,15г.

FeCl₃ (1% р-р) 1,2мл.

тиамин HCl 100г

солодовый экстракт 3г

глюкоза 10г

вода дист.1л.

среда Пахлевски рН 5,4

тарtrat аммония (C₄H₁₂N₂O₆) 0,5г/л

KH₂PO₄ 1 г/л

MgSO₄*7H₂O 0,5 г/л

CaCl₂*2 H₂O 0,05 г/л

Fe EDTA 0,02 г/л

H₃BO₃ 0,0028 г/л

MnCl₂*2 H₂O 0,003 г/л

ZnSO₄*7H₂O 0,0023 г/л

CuCl₂*2 H₂O 0,00063 г/л

Na₂Mo₄*2 H₂O 0,00027 г/л

мальтоза 5 г/л

глюкоза 20 г/л

тиамин HCl 0,1 г/л

агар 8,0 – 15,0 г/л

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Для подтверждения микоризности необходимо инокулировать растение-хозяин и при подходящих условиях получить микоризу.

Hutchison, 1991: признаки для идентификации культур ЭМ грибов:

- способность к использованию тех или иных источников углерода и азота
- скорость роста при разных температурах
- устойчивость к различным фунгистатичным и токсичным для грибов веществам
- полифенол-оксидазная активность
- реакции мицелия на красители (диазониум синий В)
- культуральная морфология (текстура, скорость роста, окраска, окрашивание среды)
- микроморфология (наличие пряжек, форма, толщина, ветвление, окраска и тип роста гиф, появление утолщений на гифах, тяжей)

Схема стерильного синтеза эктомикоризы



Микрокосмы для синтеза эктомикоризы

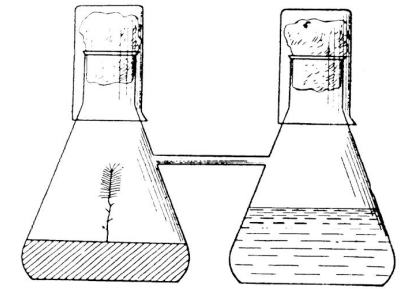


Рис. 10. Камера Мелину для получения микоризы у сосны в стерильной культуре (по Мелину, 1936)

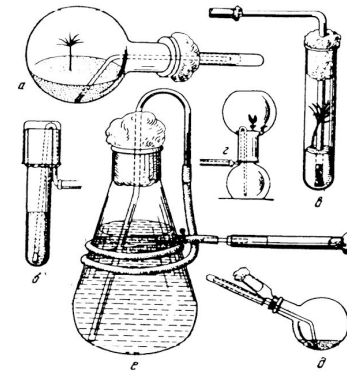


Рис. 12. Камера Доука для стерильных культур (по Доуку, 1955г)
a — 2-литровая колба с круглым дном и утолщенным краем горла; *b* — пробирка емкостью 250 мл с опущенной трубкой для смены среды; *в* — пробирка емкостью 250 мл с трубкой для смены среды, наведенная под углом 90°; *г* — комбинирование 1,5 и 2-литровых колб с плоским дном и опущенной трубкой для смены среды; *д* — 2-литровая колба с воронкой для внесения среды и отсасывающей трубкой, установленные через резиновую пробку; *е* — 3-литровая колба Эрленмейера для стерильной питательной среды с резиновой сифонной трубкой и соединяющими трубками

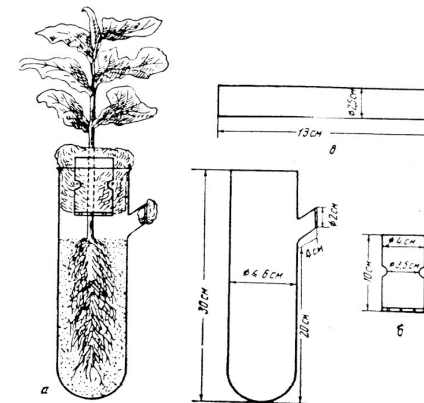
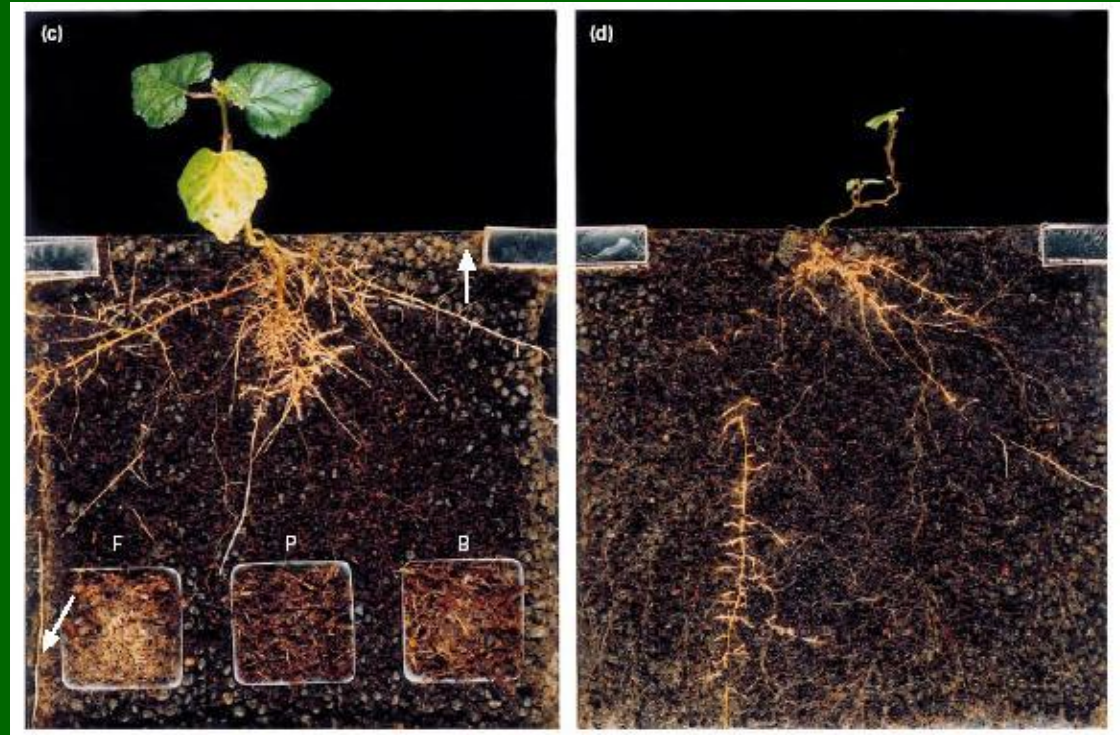
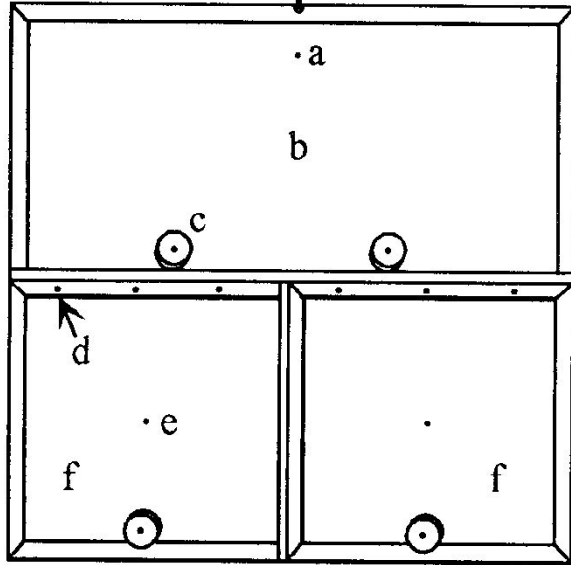
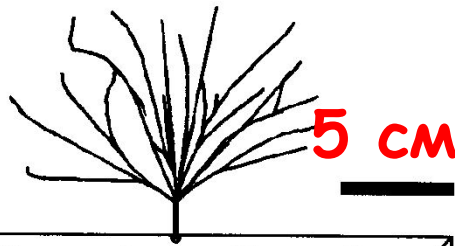


Рис. 13. Камера Шемахановой для стерильных культур (сеянцев дуба)

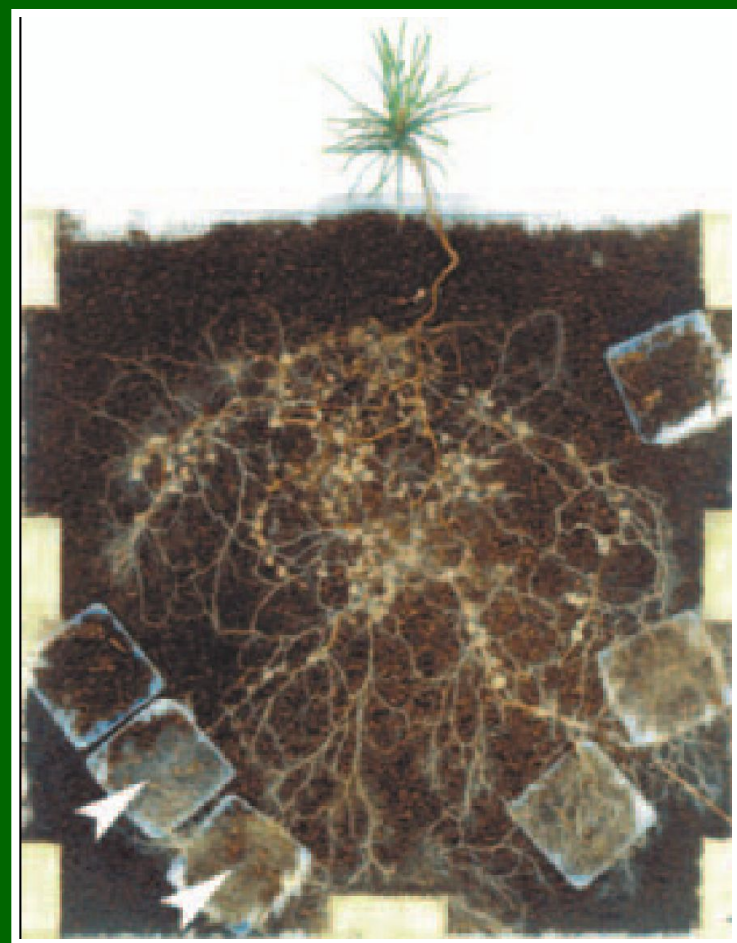
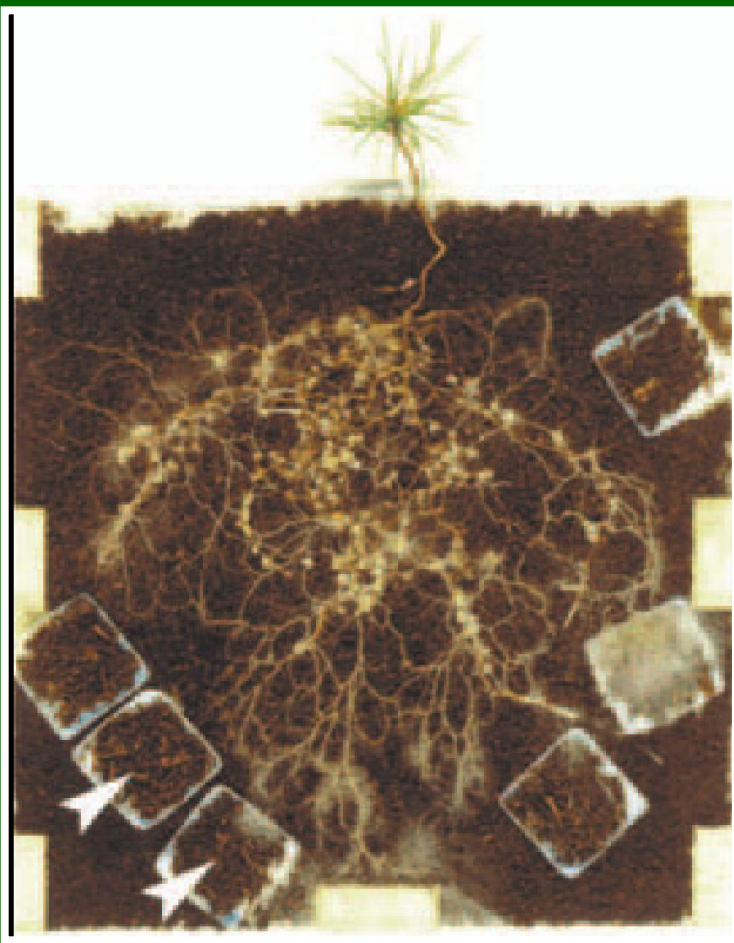
a — общий водоем; *б* — сеянец; *в* — трубка для укрепления сеянца; *г* — трубка для подсева желудей

Микрокосмы для синтеза эктомикоризы



- a** – 2 мм перфорация
- b** – отдел для растения
- c** – ловушка для CO_2
- d** – 1,5 мм перфорация
- e** – 2 мм перфорация
- f** – отдел для растения

В микрокосмах возможны эксперименты с внесением определенных веществ или микроорганизмов и оценкой их влияния на формирование и развитие симбиоза

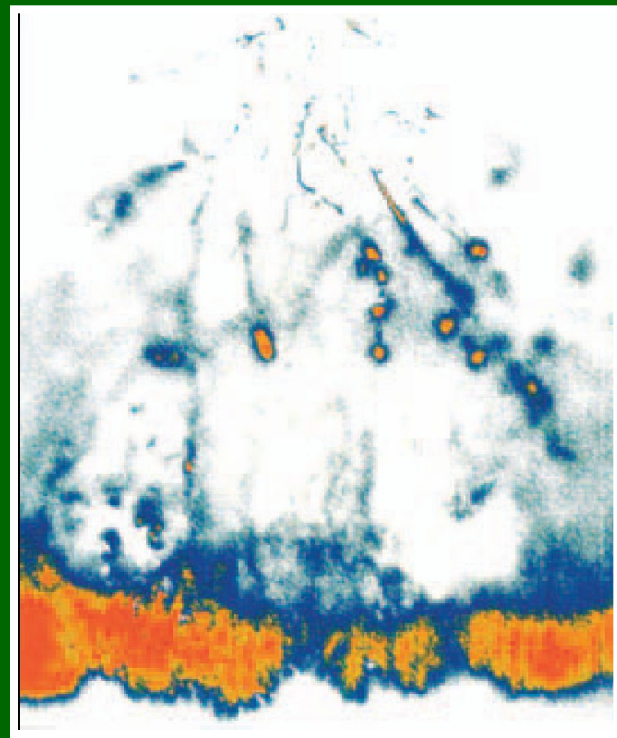


Микрокосм *Suillus bovinus* + *Pinus sylvestris*.

Разрастание мицелия на участке внесения органического вещества из лесной подстилки через 40 дн.



Микрокосм с торфом
Raxillus involutus + *Betula pendula*



Цветная лазерная сканирующая
авторадиография микрокосма через
48 ч. после внесения в побеги *Betula*
¹⁴CO₂
Меченый С (красное окрашивание) в
корнях и мицелии

Методы аксеничных и почвенных культур для синтеза эктомикориз. Аксеничные культуры

| преимущества | недостатки |
|--|--|
| сравнительно быстрый и эффективный метод для исследования ЭМ грибов на совместимость с разными видами растений | отсутствие роста в культуре некоторых совместимых с растением видов грибов или отсутствие микоризообразования в искусственных условиях |
| уверенность в том, что микориза образована именно инокулированным видом гриба | образование в культуре микориз, не встречающихся в природе или, напротив, совместимость гриба с хозяином снижается в культуре |
| отсутствие факторов или почвенных организмов, подавляющих микоризообразование или рост растения | отсутствие почвенных факторов или микроорганизмов, способствующих в почве росту гиф и микоризообразованию (например, МНВ-бактерии) |

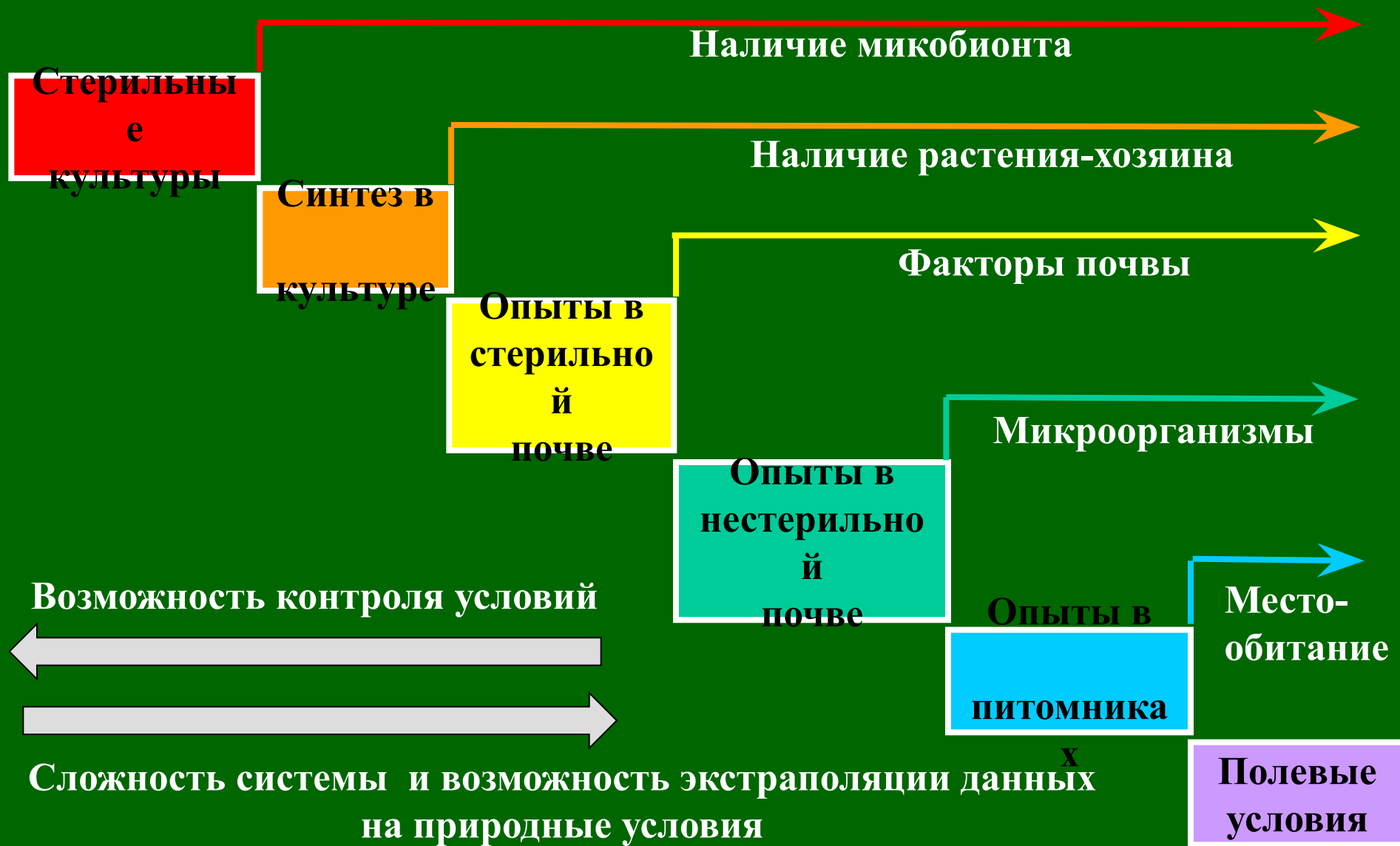
Аксеничные культуры

| преимущества | недостатки |
|---|---|
| возможность получения чистого материала без примесей для исследования анатомии и физиологии; возможность наблюдения и подсчета гиф | изменение элементов структуры микориз и их физиологии из-за необычных условий (обилие углеводов в среде, освещение, аномальный уровень растительных гормонов) |
| возможность наблюдения микоризообразования под биноклем и отбора образцов корней определенного возраста для микроскопирования и экспериментов по физиологии | необходимость дорогостоящего оборудования для аксеничного культивирования гриба и выращивания растений при заданных условиях |
| возможность подбора и варьирования таких факторов как температура, рН, осмос | возможность аномалий физиологии и роста растения-хозяина из-за ограниченности пространства, высокого уровня освещения и т.п |

Нестерильные почвенные культуры

| преимущества | недостатки |
|--|--|
| возможность выбора между разными типами инокулюма, что позволяет использовать широкий спектр видов грибов для стерильных культур | трудность отделения корней от почвы без повреждения и потерь |
| возможность максимального приближения почвенных условий к естественным | невозможность отслеживания стадий микоризообразования, возраст анализируемых корней часто неизвестен |
| меньшая трудность экстраполяции полученных данных на полевые условия | невозможность предотвращения попадания нежелательных микроорганизмов и почвенных животных |
| рост растения приближен к росту в естественных условиях | трудность отбора и наблюдения почвенных гиф |

Взаимосвязь между сложностью и возможностью контроля экспериментальных систем исследования микориз



Микрокосм vs полевые исследования

Микрокосм

Достоинства

- Возможность контроля и варьирования
 - факторов среды (освещения, t° , влажности и пр.)
 - физико-химических характеристик субстрата (распределение и потоки пит. в-в)
 - объема и глубины залегания корней
- Возможность наблюдения корневой системы полностью
- Возможность работы с заданными видами и генотипами симбионтов
- Возможность работы с микробной составляющей и мезофауной (при выборе сетки различного диаметра)
- Возможность сравнения

Недостатки

- Отсутствие природных флуктуаций и экстремальных значений влажности, концентрации пит. в-в
- Отсутствие сезонности
- Краткие сроки проведения опыта
 - Ранние стадии цикла развития растения (без репродуктивной фазы)
 - Редко прослеживается весь цикл развития
 - Изучение преимущественно короткоживущих травянистых форм
 - Отсутствие крупных представителей почвенной фауны (черви, личинки насекомых)

Микрокосм vs полевые исследования

Микрокосм

Достоинства

- Возможность исследования особенностей микоризы известных видов и генотипов грибов в чистой, моноксенной и смешанной культуре с различными видами растений-хозяев

Недостатки

- Использование в качестве инокулюма спор или фрагментов мицелия (фактически, отображение нарушенных условий обитания)
- Однообразие субстрата меняет соотношение ключевых функциональных групп биоты
- Опыты с внесением живых культур требует стерилизации почвы, что вызывает серьезные и трудно учитываемые последствия

Микрокосм vs полевые исследования

Полевые исследования

Достоинства

- Получение данных, отображающих реальную ситуацию в природе:
 - климатические условия
 - структура почвы (включая мозаичность)
 - биоразнообразие и количественный состав биоты
 - присутствие естественных сообществ микобионтов
- Возможность проведения долгосрочных наблюдений или опытов с полным охватом циклов развития

Недостатки

- Сложность изучения подземной части сообщества без серьезных нарушений его целостности
- Возможность серьезных нарушений изучаемых сообществ ввиду пожаров, атак паразитов и пр.
- Проблематичность выявления влияния отдельного фактора
- Сложность выделения корневой системы целиком или учета, какая ее часть подвергнута изучению
- Невозможность селективной элиминации определенных видов или групп микробиоты, что осложняет оценку их влияния

Микрокосм: элементы, необходимые для приближения исследования к природным условиям

Подземная часть сообщества: почва и микробиота

- Подбор почвы, качественно и количественно близкой по составу к природной в изучаемом сообществе
- Подбор типа почвы, который может быть подвергнут стерилизации (НМ контроль) без существенного изменения физико-химических свойств
- Подбор генотипов симбионтов, присущих изучаемому сообществу и включение симбионтов разных типов микориз для учета взаимодействий между ними

Надземная часть сообщества: растения и растительоядные

- Выбор характерного и широко распространенного типа растительного сообщества
- Включение ключевых видов и функциональных групп (напр., для луга или степи: злаки (АМ), осоки (НМ), другие травы (в разной степени восприимчивые к ОМ), бобовые (клубеньковый симбиоз), орхидные (ОМ), кустарнички (АМ, ЭМ, ЭрМ), мхи). Сообщество должно быть реконструировано с учетом фенологии (посев, пересадка и пр.)

Микрокосм: элементы, необходимые для приближения исследования к природным условиям

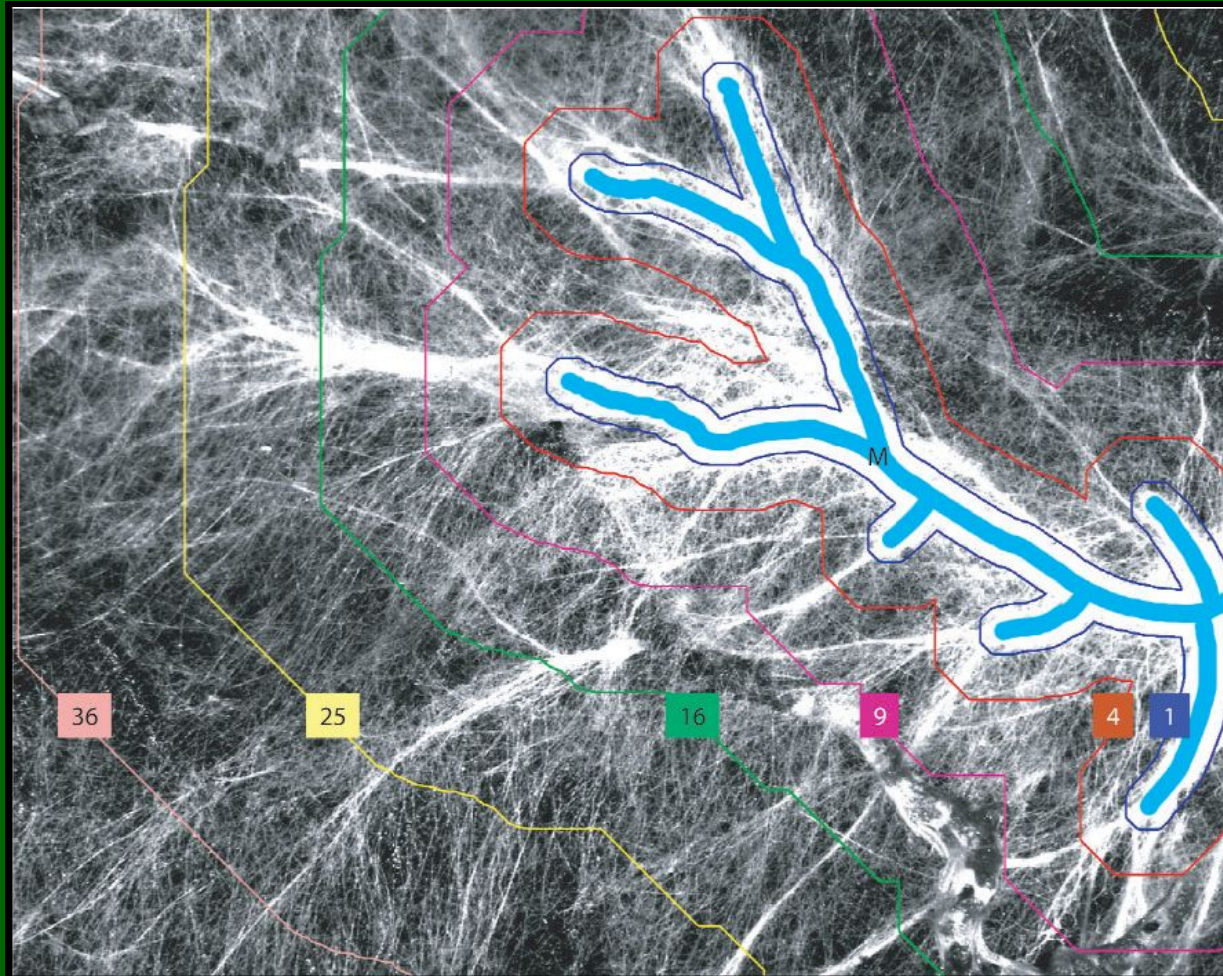
Подземная часть сообщества: почва и микробиота

- Внесение инокулюма в «природной» форме: мицелиальная сеть для естественных местообитаний, споры и фрагменты мицелия – для нарушенных
- Введение основных функциональных групп микробиоты (МО и микрофауны), напр., микофилов и фитопатогенов, со структурой популяций и в количествах, близких к имеющимся в природных почвах

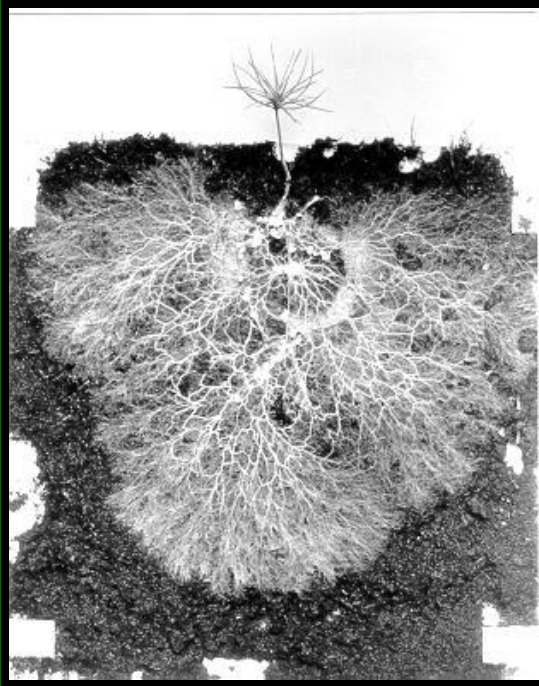
Надземная часть сообщества: растения и растительоядные

- Представители каждой группы должны быть включены в виде природных генотипов
- Включение растительоядных организмов (выедание) с экологически реалистичным разнообразием и количественными характеристиками
- Включение изменений сообщества (действия сезонности, засухи, внесение дополнительных элементов питания)

«Полуколичественный» метод оценки количества экстраматрицального мицелия ЭМ на разных расстояниях от корня (по Agerer, Raidl, 2004)



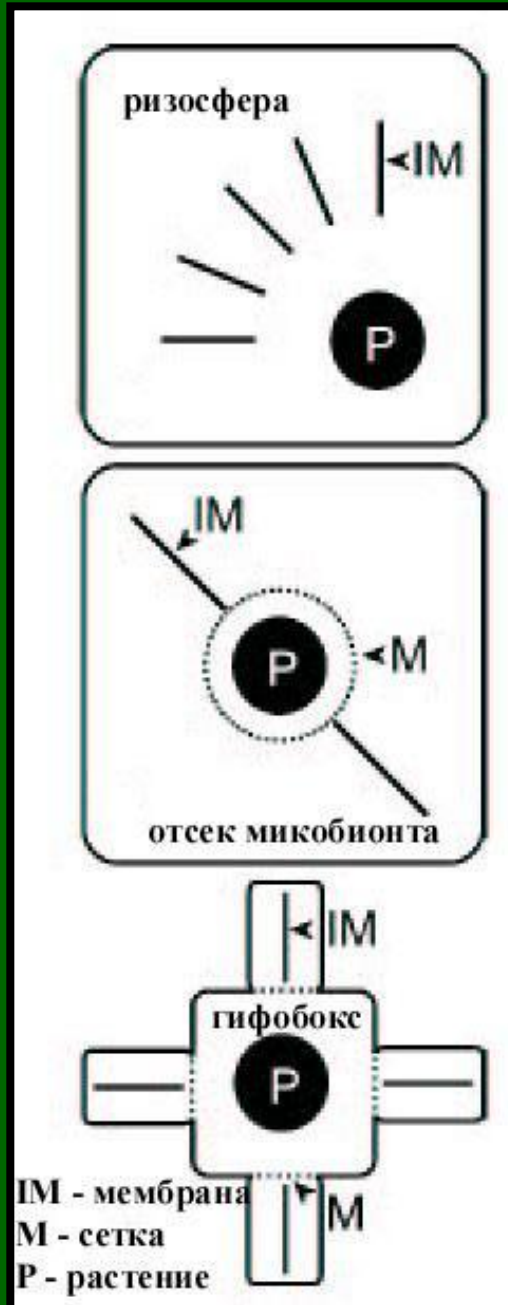
Методы исследования свободного мицелия



эктомикориза



арбускулярная микориза



Метод вставочных мембран

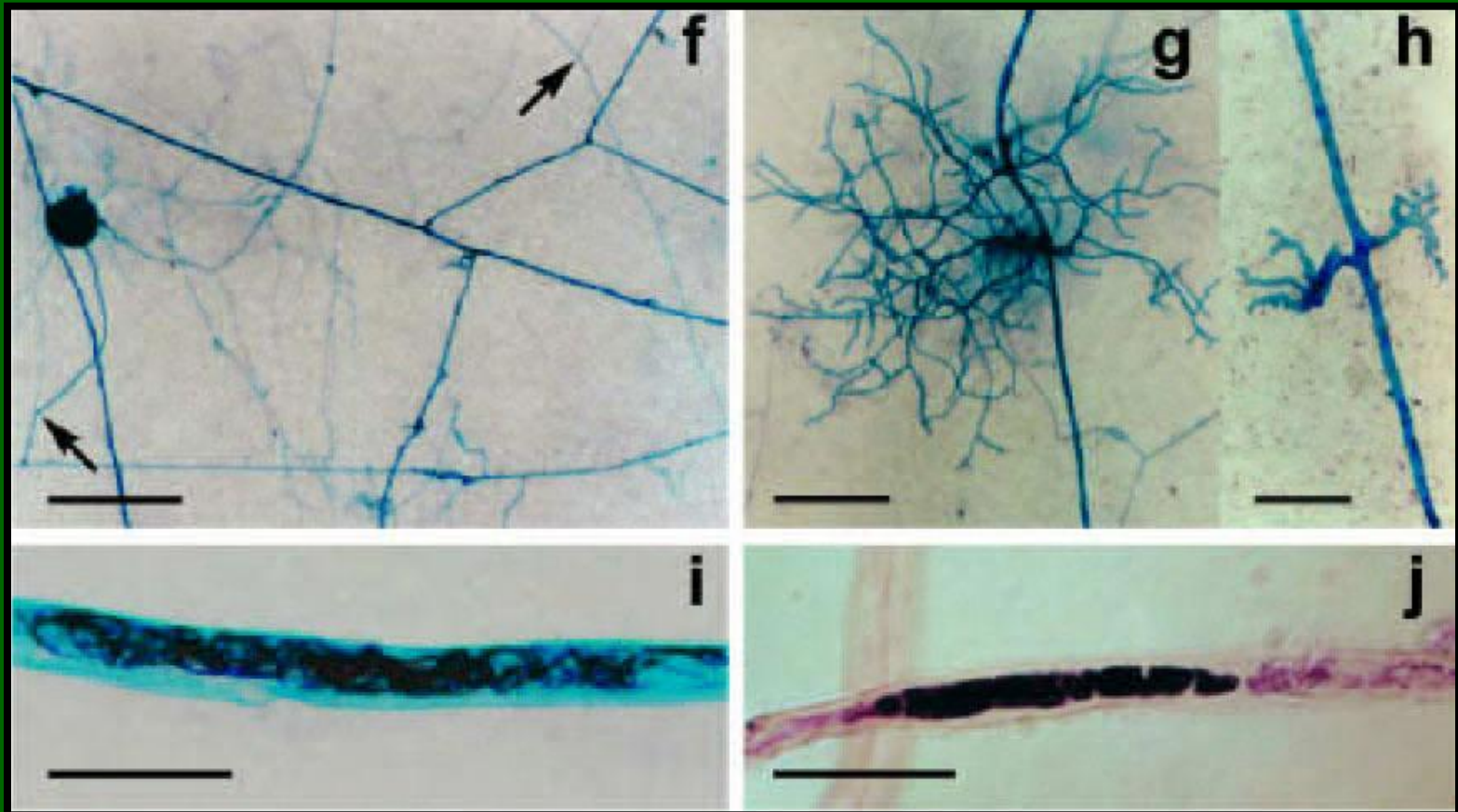
модификация метода мембранных фильтров

Целлюлозо-нитратный или целлюлозо-ацетатный мембранный фильтр с размером пор 0.45-0.6 μm помещают в микоризосферу растения-хозяина

Методы исследования свободного мицелия

Затем фильтры с мицелием вынимают, окрашивают трипановым синим для вычисления общей длины гиф (**f, g, h**) и красителями на белок для установления жизнеспособности мицелия (**i, j**).

Экстраматрикулярный мицелий остается интактным, что делает возможным изучение его морфологии.



Микоризосфера

1904 – Хилтнер ввел термин «**ризосфера**», наблюдая увеличение численности микроорганизмов в прикорневой зоне

1953 – Торнтон ввел термин «**гифосфера**» - совокупность микроорганизмов, приуроченных к поверхности гиф

Начало 1970-х – Рамбелли сформулировал понятие о «**микоризосфере**», т.к. в лесных сообществах взаимодействие большей части древесных корней с почвенной микробиотой опосредовано гифальными чехлами микоризообразующих грибов



Микоризосфера

- Методы исследования принадлежат к **стандартным методам почвенной микологии**, в частности, методам анализа ризосферы.

- В пределах микоризосферы иногда, как и в ризосфере, выделяют зоны по мере удаления от микоризной поверхности (микоризоплана, собственно микоризосфера).

- Методы: смывы с корней
посевы методом разведений
посевы с фрагментов корней.

Анализ микоризосферной микробиоты чаще всего проводится в **микрокосмах**.



Молекулярные методы исследования микориз



Применение молекулярно-генетических методов для исследования микориз

I Исследование вклада симбиоза в динамику экосистем (новое направление в экологии – **молекулярная экология**):

1. распределение в почве микоризных грибов (взгляд на подземное сообщество – кто в действительности обитает на корнях)

2. что происходит при нарушении структуры сообществ в результате пожаров, загрязнений и т.п.

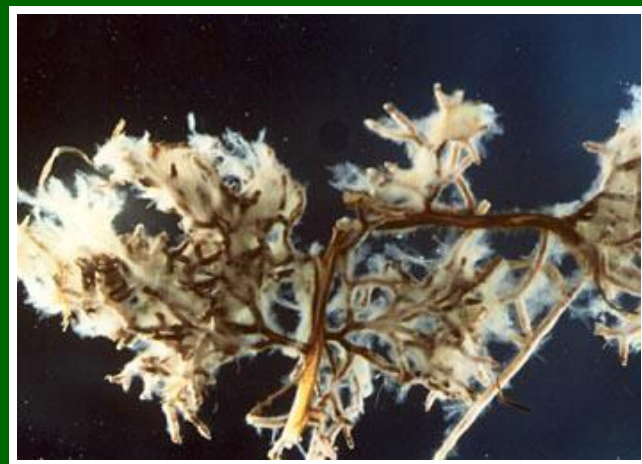
3. выявление генотипов грибов и изучение структуры популяций и границ индивида, что у грибов далеко не очевидно.

Применение молекулярно-генетических методов для исследования микориз

II идентификация чистых культур микоризообразователей

III идентификация микобионтов непосредственно из микоризных окончаний

IV исследование этапов развития микоризы и взаимодействия симбионтов (генетические методы)



Внедрение молекулярных методов позволило:

- **Количественно** изучать сообщества ЭМ грибов, распространение их в природе.

Оценить видовое разнообразие и роль в сообществе видов ЭМ грибов **без ПТ** или с **гипогейными** или **малозаметными ПТ**



Cenococcium

+

Picea



Rhizopogon



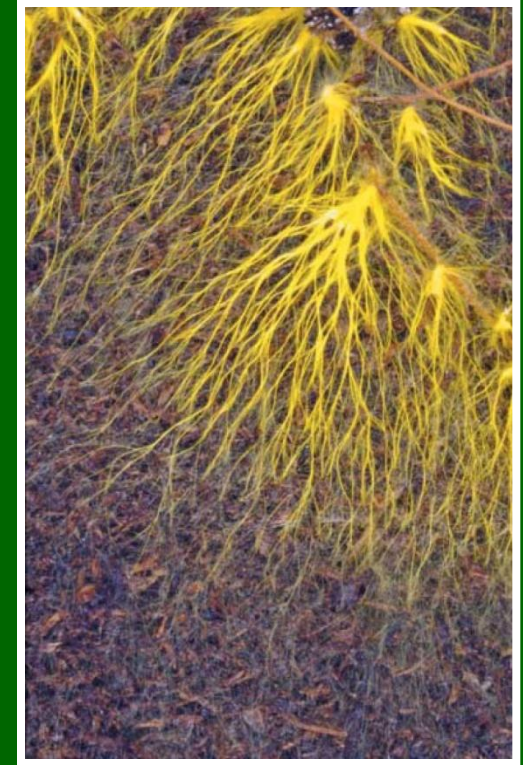
Tomentella



Gautieria

Внедрение молекулярных методов позволило:

- Изучать **свободный мицелий микоризных грибов**, который очень трудно или невозможно идентифицировать морфологическими или культуральными методами
- Исследовать **генотипы грибов** и их связь с физиологией микоризы
- Исследовать организмы **микоризопланы и микоризосферы**
- Идентифицировать **микобионт непосредственно из ЭМ окончаний**.



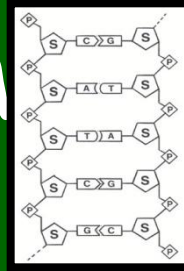
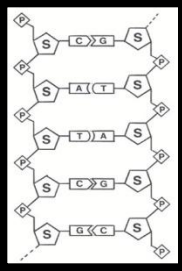
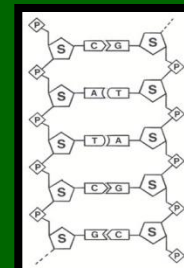
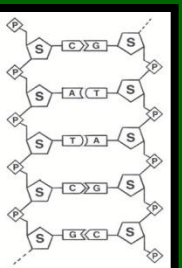


Схема идентификации микобионта ЭМ молекулярными методами:

1. Выделение (экстракция) ДНК из микоризного окончания
2. Накопление нужного участка ДНК (ITS-области (спейсеры) р ДНК или гены) методом ПЦР (полимеразной цепной реакции)
3. Анализ полиморфизма ДНК (RAPD, RFLP и др.)
4. Секвенирование
5. Идентификация полученной последовательности путем сравнения с последовательностями, имеющимися в GenBank.

Наиболее продуктивное использование

методов молекулярного анализа – в совокупности с анализом на основании морфологии.

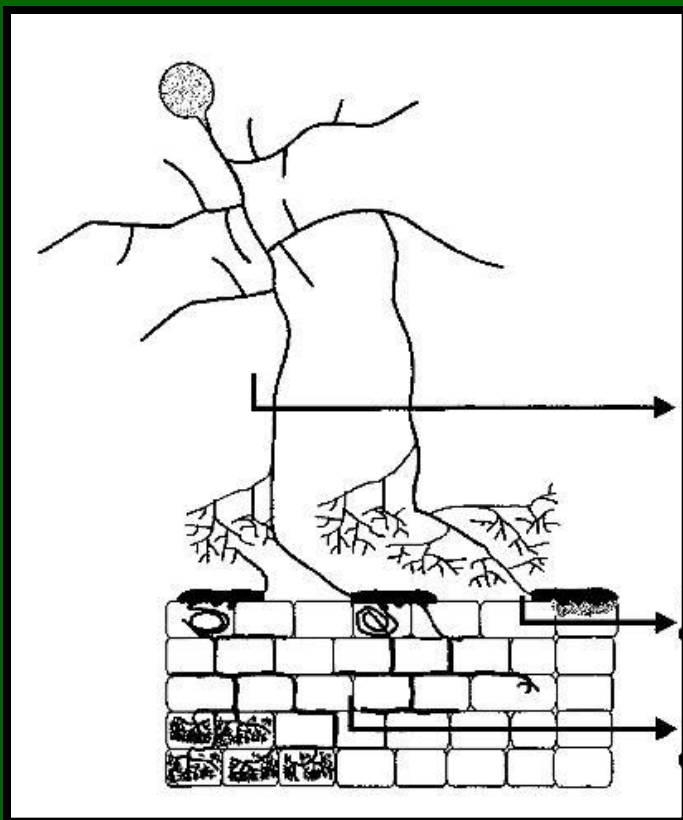


Недостатки молекулярных исследований микориз:

- Получаемые данные принципиально несравнимы (методы экстракции ДНК, ПЦР и т.д.)
- Эталонные последовательности, с которыми сравнивают результаты, грешат ошибками и неточностями определения.
- Получаемые данные о подземной структуре ЭМ сообщества зачастую противоречат результатам, полученным методом картирования, и объяснить это трудно (в подземной части сообщества никак не отражены виды, активно образующие ПТ).
- Микоризное окончание может быть устойчивым сообществом двух и более видов грибов, чьи ДНК выделяются совместно.
- Методы все еще дорогостоящи, поэтому количество исследуемых проб минимизируется, иногда в ущерб качеству эксперимента

Перспективы молекулярно-генетических исследований микоризообразующих грибов

I Анализ отношений симбионтов на молекулярно-генетическом уровне, выявление природы сигналов, определяющих возникновение симбиоза



Получение мутантов растений с блоком микоризообразования на разных этапах

несовместимое растение

мутант Mus^{-1} (ранняя стадия)

мутант Mus^{-2} (поздняя стадия)

Перспективы молекулярно-генетических исследований микоризообразующих грибов

II Исследование **экспрессии генов**, непосредственно связанных с явлением симбиоза (процессами транспорта веществ между симбионтами, умеренной защитной реакции растения и пр.)

III Исследование **генетического и эколого-физиологического разнообразия** микобионтов микориз

IV Установление **специфичности симбиозов** (ОМ, ММ) и перспективы филогении растений по связям с микобионтами

V Функциональное и таксономическое **разнообразие мико- и микробиоты микоризосферы**