

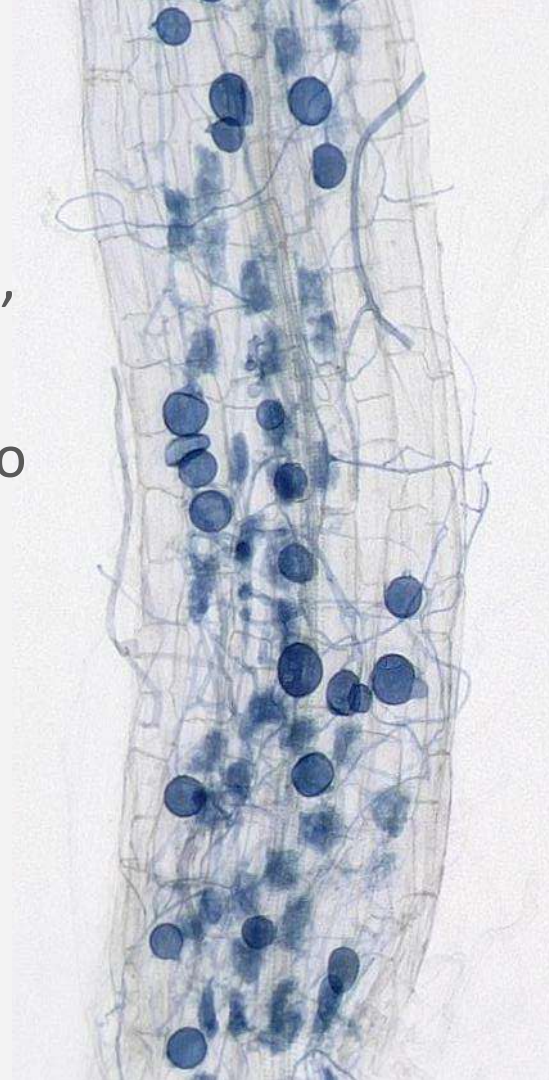
The background of the slide is a dark field filled with a complex, branching network of thin, light blue lines representing mycelium. Scattered throughout this network are numerous small, bright green circular spots, which are likely spores or hyaline droplets. The overall appearance is that of a microscopic view of a fungal culture.

Микоризы *in vitro*

Работу выполнил: Приходько А. В.
Научный руководитель: Воронина Е. Ю.

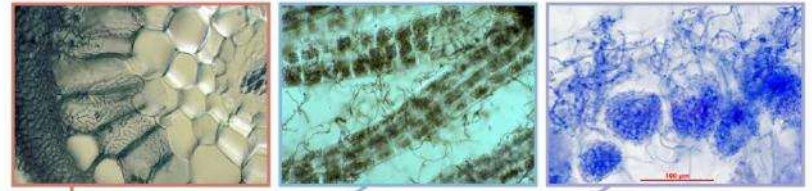
Микоризы – повсюду

- ◆ 85% сосудистых растений образуют микоризы, многие – облигатно
- ◆ Все виды гломусовых образуют арбускулярную микоризу (АМ)
- ◆ 25000 грибов из других таксонов – эктомикоризу (ЭМ)
- ◆ Грибы и растения эволюционировали вместе, начиная с выхода на сушу ~ 450 млн. л. н.

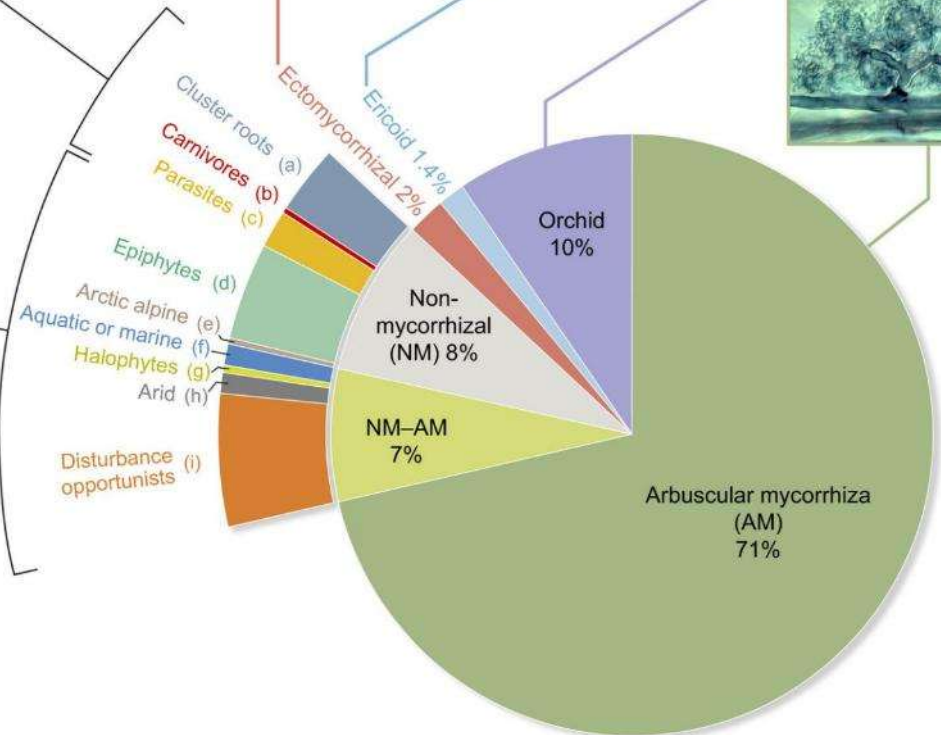




Nutritional specialists



Habitat specialists



Историческая справка

- ◆ Первые упоминания – Древняя Греция
- ◆ Активные исследования начались в XIX веке.
Исследуется морфология, различия типов микориз
- ◆ Ресинтез эктомикоризы – 1920 г. (Melin, E.)
Воссоздание симбиоза в культуре с саженцем
- ◆ Ресинтез арбускулярной микоризы – 1953 г. (Mosse, B.)
Горшечные культуры, исследования транспорта, отношений между симбионтами

Историческая справка



Elias Melin



Слева направо:
F. Sanders,
G. Hadley, **V. Mosse**, G.
Bowen (1-й справа)



Guillaume
Bécard



J. André
Fortin

Что такое моноксеничная культура?

- ◆ Культура, содержащая ещё **один вид**, помимо культивируемого
- ◆ В случае микориз это **корни** совместимых растений
- ◆ Симбиотическими называют моноксеничные культуры, которые: образуют **функциональные споры**, описаны в публикации **в рецензируемом журнале**, хранятся **в банке культур *in vitro***
- ◆ Под эти условия подходят АМ культуры, но **не ЭМ**

Устройство микориз

ЭМ: Basidiomycota, Ascomycota,
Mucoromycota
В основном древесные растения



Чехол, сеть Гартига, свободный мицелий, ризоморфы

АМ: Glomeromycota
И травянистые, и древесные



Арбускулы, везикулы, гифальные клубки, АПП, ВПС, свободный мицелий

Строение АМ

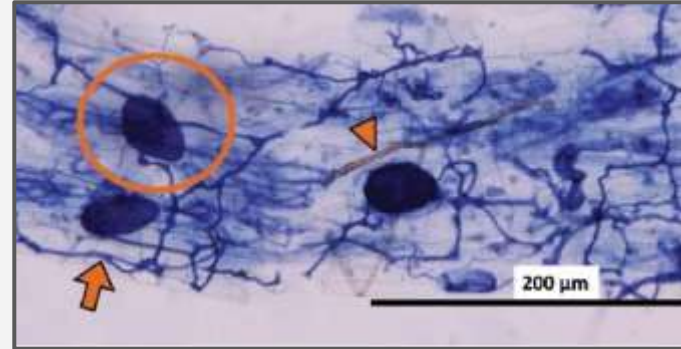
1 - Арбускула

2 - Везикулы

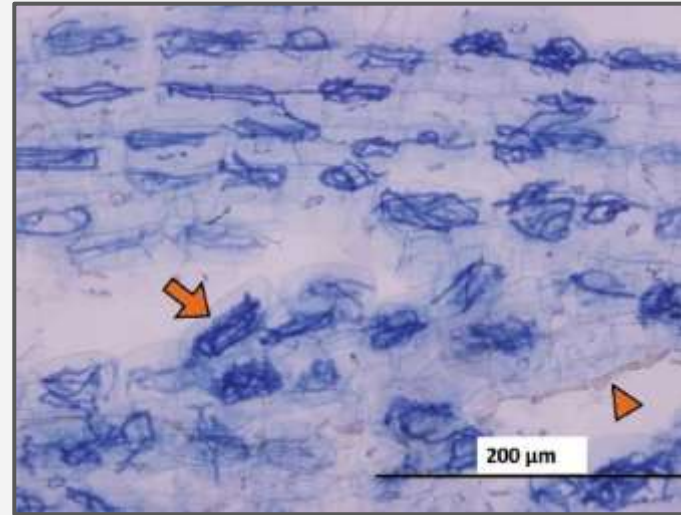
3 - Гифальный клубок



1



2



3

Строение ЭМ

Senecosium geophilum
в корне *Pinus sylvestris*

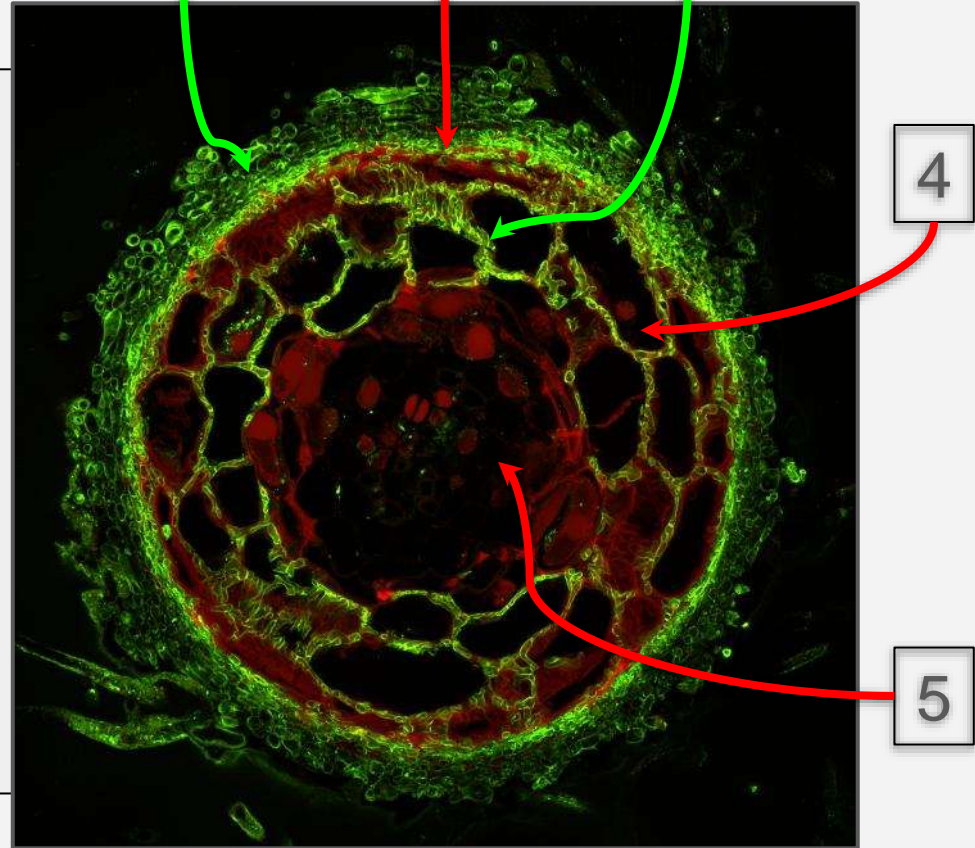
1 - чехол

2 - ризодерма

3 - сеть Гартига

4 - клетки кортекса

5 - центральный цилиндр



Строение ЭМ

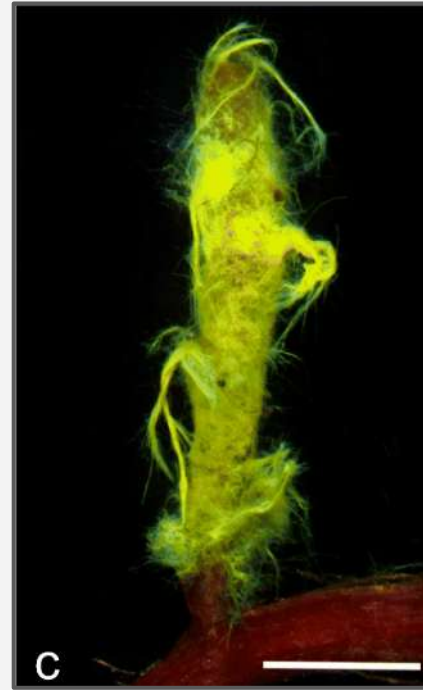
Разнообразиие корневых окончаний



*Cenococcum
geophilum*



Russula sp.



*Piloderma
olivaceum*

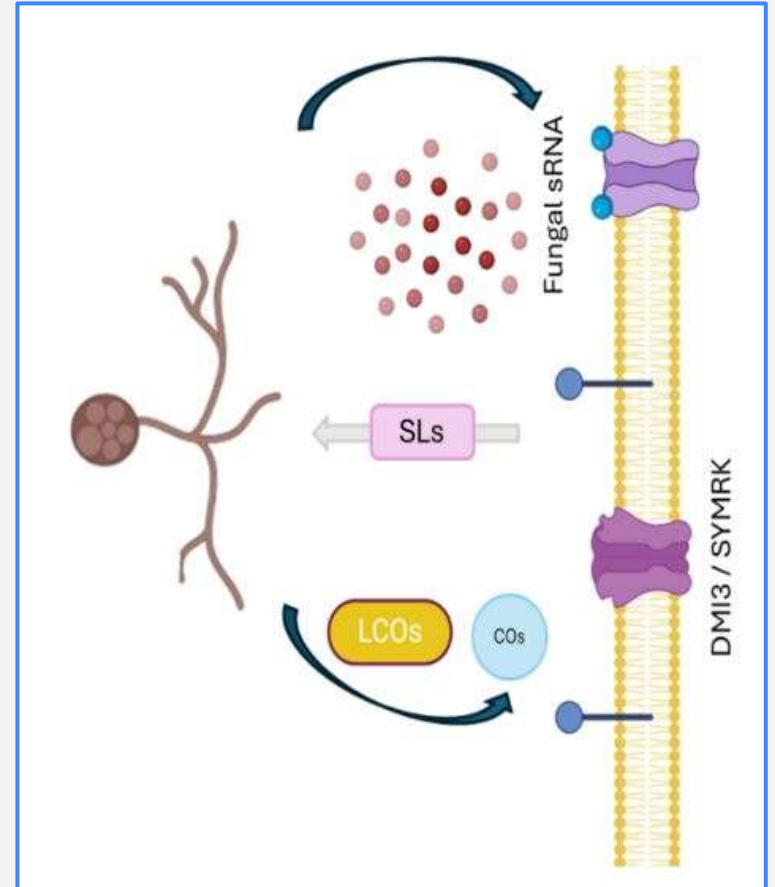
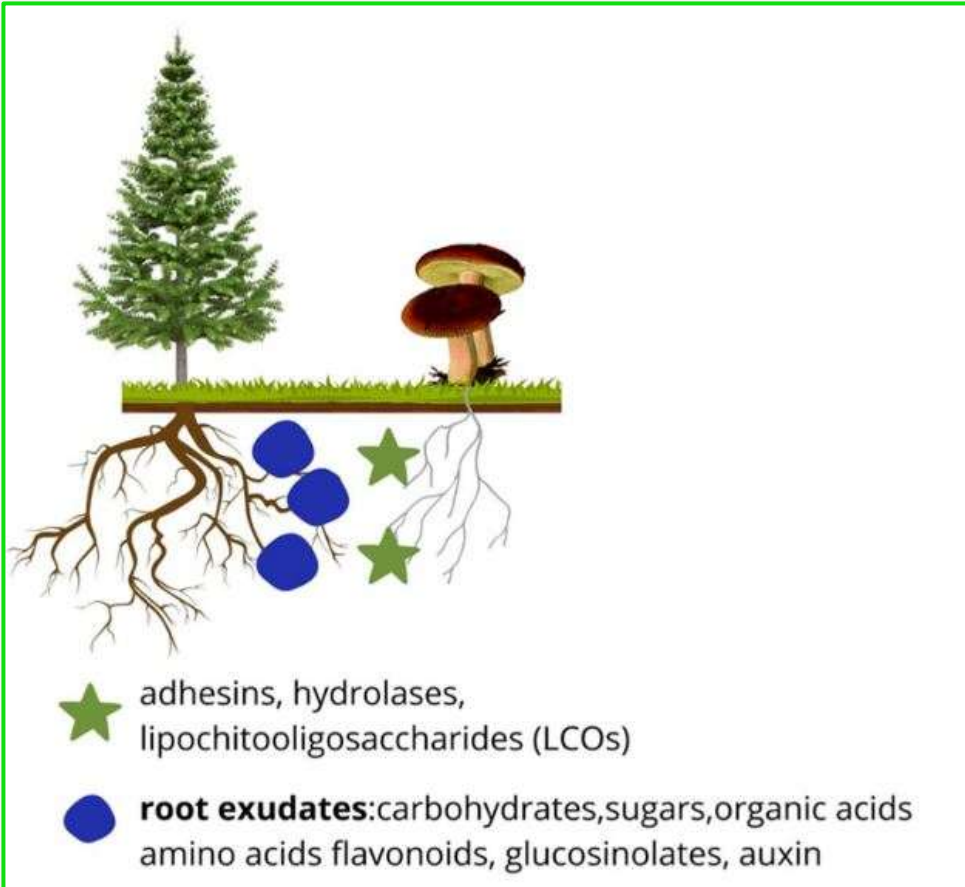


Cortinarius sp.

Этапы формирования микориз

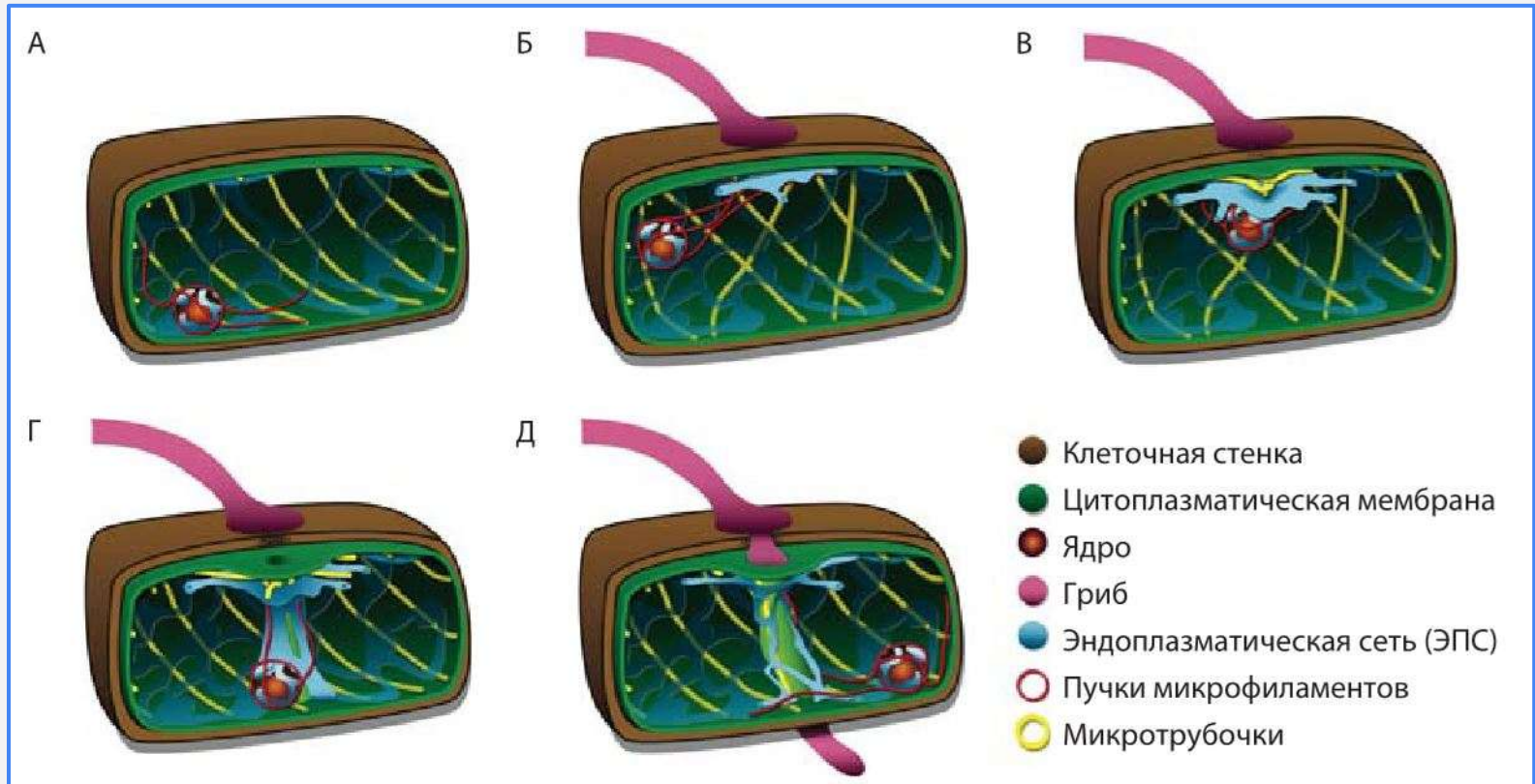
- I. Прораствание спор - регулируется **стриголактонами**, **флавоноидами**, органическими кислотами корневых экссудатов (**масляной**, **глюконовой**, **аминокислотами**)
- II. Пресимбиотический рост - **хитоолигосахариды** и **липохитоолигосахариды** грибов ингибируют иммунитет растения, активируют **общий симбиотический путь**
- III. Контакт и проникновение - **АМ** грибы формируют **аппарат**, **предваряющий проникновение**, ЭМ с помощью **литических ферментов**
- IV. Установление симбиоза - зона контакта в виде **арбускул/клубков** или **сети Гартига**
- V. Старение - зоны контакта активны лишь несколько недель

Сигналинг



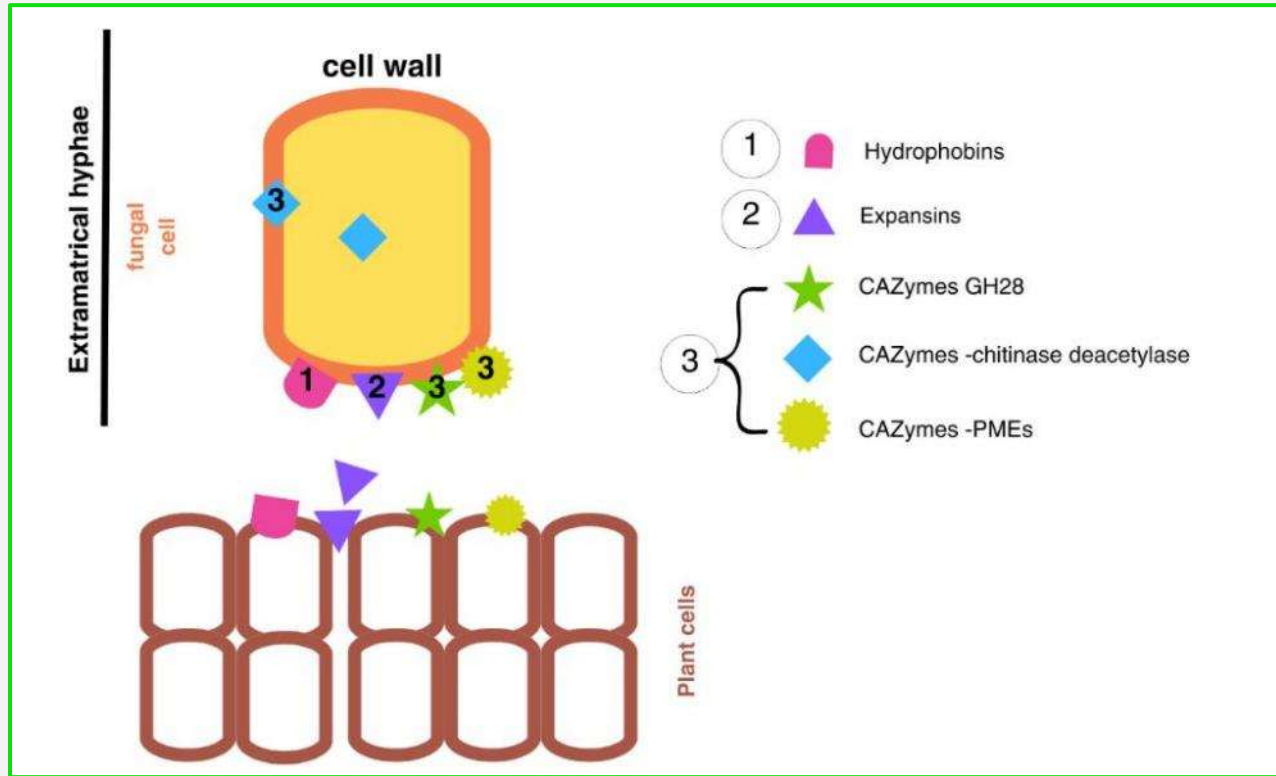
Контакт у АМ

Аппарат, предваряющий проникновение



Контакт у ЭМ

Ферменты роста растяжением и гидролазы



Типы культур АМ грибов

- ◆ Горшечные культуры

Моноксеничные:

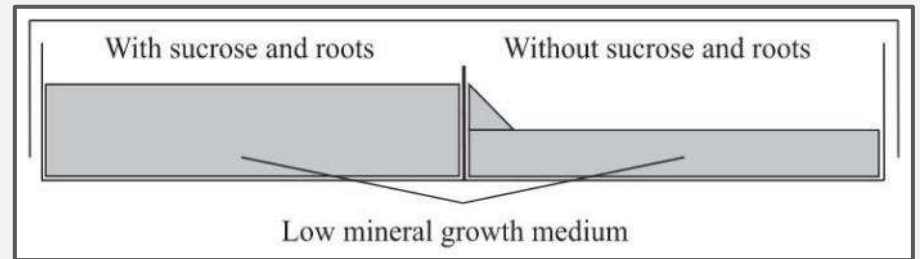
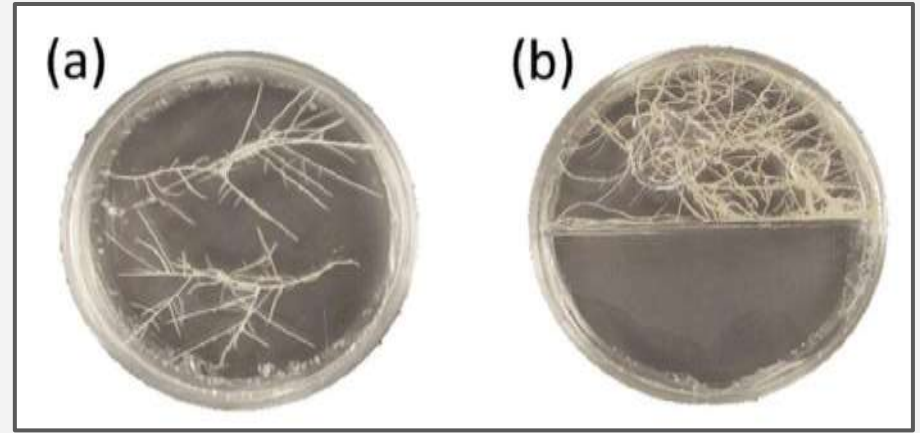
- ◆ С нативными корнями

- ◆ С модифицированными *Agrobacterium rhizogenes* корнями

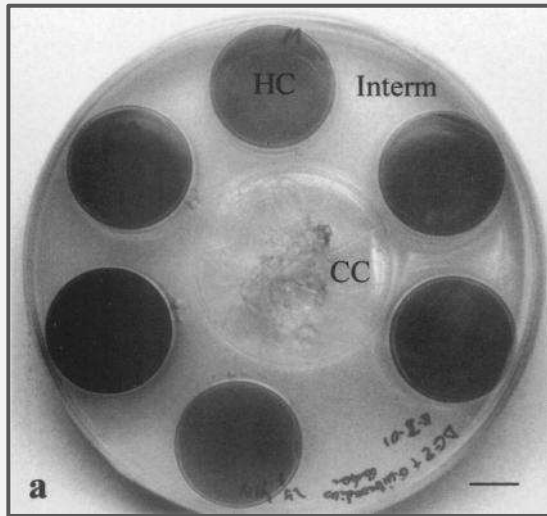
- ◆ С одним компарментом

- ◆ С двумя компартментами

- ◆ Модификации



Модификации



Со множеством
компарментов



С побегом



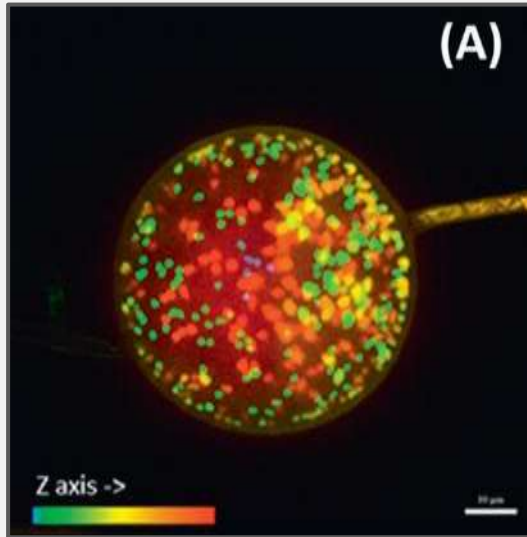
С почвой

Протокол создания моноксеничных культур

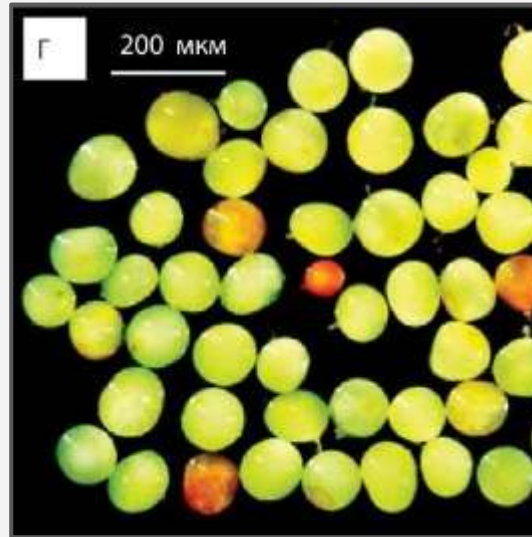
- ◆ Получение стерильного инокулюма - из спор, колонизированных корней, спорокарпов или везикул у АМ или из мицелия у ЭМ
- ◆ Получение корней АМ - стерилизация, инокуляция бактериями, избавление от бактерий - необходимо 3 раза пересадить корни на среду с антибиотиками
- ◆ Приготовление среды
- ◆ Всадка на среду и инокуляция
- ◆ инкубация

Получение инокулюма

- ◆ Для АМ грибов с некрупными спорами используют корни (нек. *Glomus*), для крупноспоровых, например Gigasporaceae - споры
- ◆ Споры базидиальных грибов мелкие и плохо прорастают в ЧП



Спора *Rhizophagus irregularis*



Споры *Gigaspora gigantea*



Споры *Suillus lakei*

Получение и стерилизация инокулюма

- ◆ Сбор **почвы** из естественных местообитаний или горшечных культур
 - ◆ Фильтрация через **сита** с ячейей 500, 106 и 38 нм, либо **центрифугирование** в градиенте плотности
 - ◆ **Очистка** от частиц почвы и **промывание** стерильной водой
 - ◆ Обработка **бактерицидными** веществами
-
- ◆ В случае эктомикориз удобно брать инокулюм из **чистой культуры мицелия**

Трансформация корней

◆ АМ – культуры *Daucus carota*

Фрагмент **корнеплода** стерилизуют в спирте и гипохлорите натрия.

Инокулируют суспензией *A. rhizogenes*

Троекратно пересевают на агаризованную среду **с антибиотиком**

◆ ЭМ – нет универсального растения, выбор зависит от вида гриба

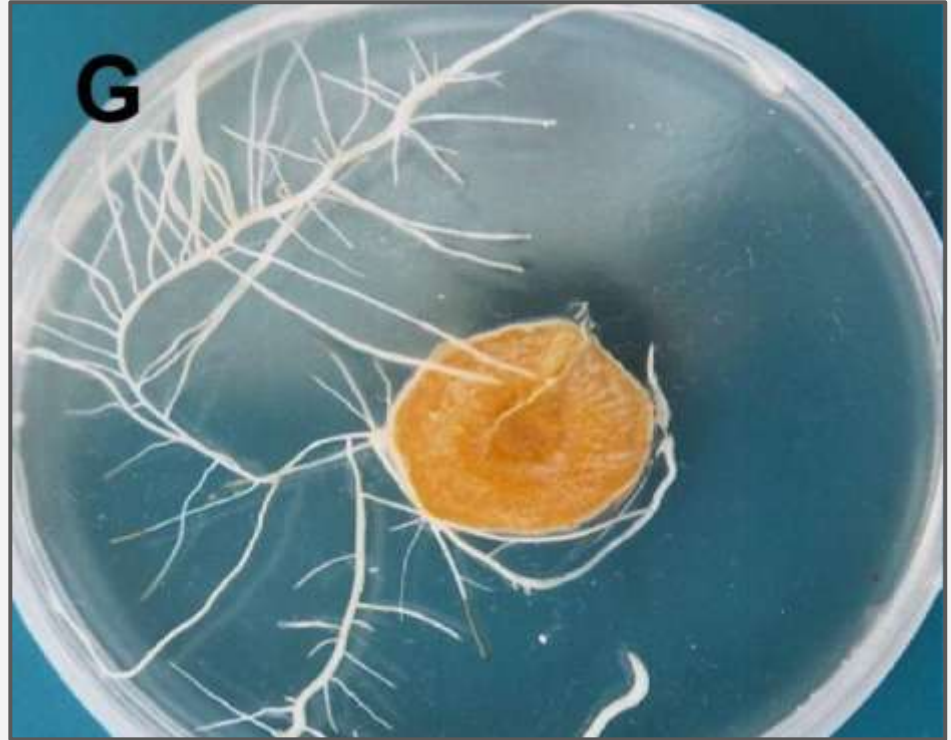
Cistus incanus – хороший вариант, подходит для многих грибов, по культуральным свойствам их корни схожи с корнями моркови.

Из семян **стерильно** выращиваются **молодые растения**.

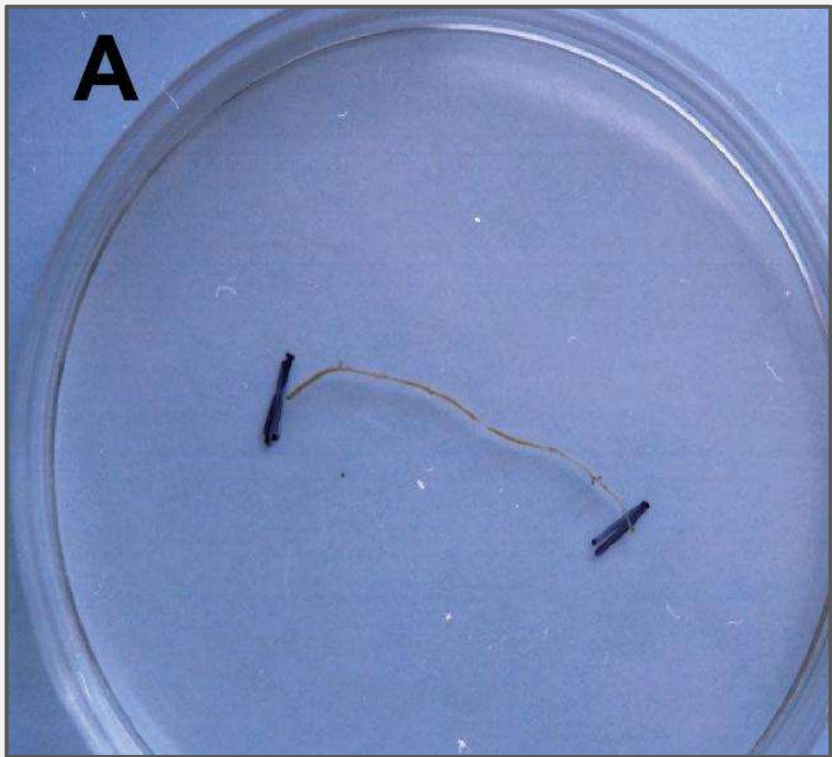
На третьей неделе удаляются корни, инокулируется **эпикотиль**.

Особенности трансформированных корней

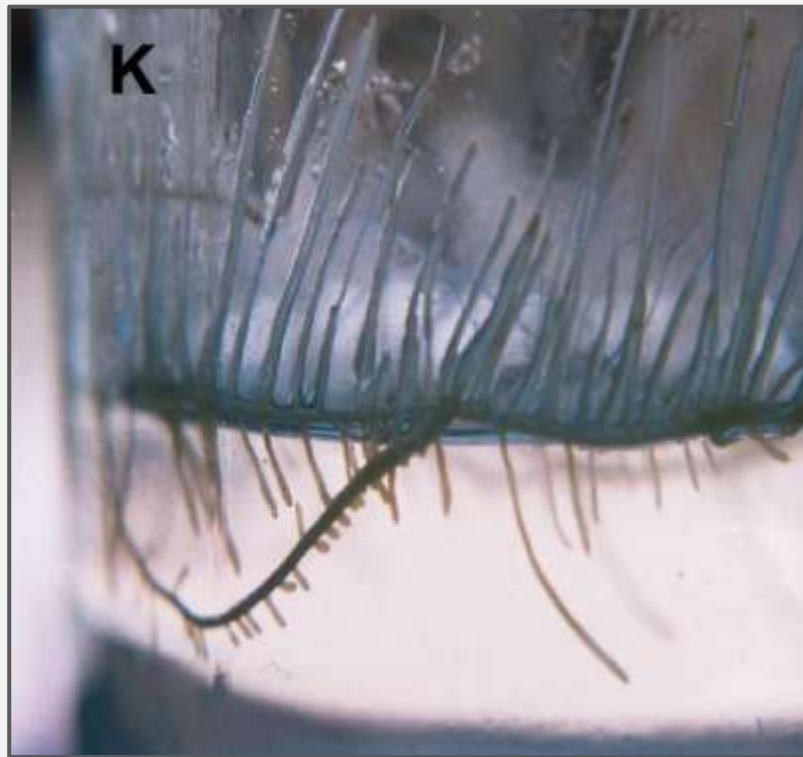
- ◆ Отрицательный геотропизм. Чашки Петри культивируют вверх дном
- ◆ Не требуют внесения в среду растительных гормонов
- ◆ Лучше идёт колонизация
- ◆ Синтез опинов. По нему можно определить успех колонизации



Особенности трансформированных корней



Нетрансформированный
корень



Трансформированный
корень, - геотропизм

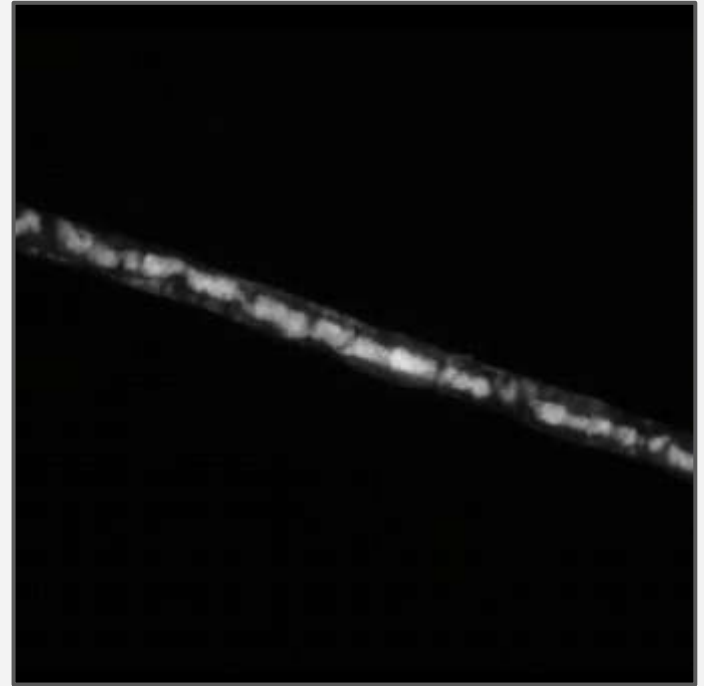
Среды для моноксеничных культур

- ◆ Среды должны подходить как для растения, так и для гриба
- ◆ Берут своё начало от сред для культивации растений *in vitro*
- ◆ В корневой компартмент добавляется сахароза, либо не добавляется в культурах с побегом.
- ◆ Для АМ типично используются минимальная среда и среда Струллу-Романда

- ◆ Для ЭМ грибов подходят среды для АМ, а также среда N5, аналогичную среде MS с добавлением KNO_3 и NH_4NO_3

Значение: агрокультура и лесное хозяйство

- ◆ В симбиозе гриб снабжает растение фосфором, получая взамен до 30% растительных ассимилятов
- ◆ Показано повышение фиксации азота в клубеньках бобовых
- ◆ Существуют предприятия, производящие АМ инокулюм для хозяйств, стремящихся снизить использование фосфатных удобрений и/или повысить урожайность.



двунаправленный транспорт в гифе

Значение: агрокультура и лесное хозяйство

- ◆ Однако, микоризация повышает прирост биомассы только при дефиците фосфора у растения, что не совместимо с с/х. При избыточном минеральном питании биомасса убывает
 - ◆ Существует специфичность штаммов грибов и растений-хозяев
 - ◆ При внесении инокулюма всегда есть конкуренция с естественным почвенным сообществом
 - ◆ Перекапывание почвы разрушает сложившиеся сети мицелия
-
- ◆ ЭМ улучшают приживаемость саженцев при восстановлении лесов, инокуляция оказалась эффективна в лесных хозяйствах

Биоремедиация

- ◆ Колонизированные грибами растения более устойчивы к биотическим и абиотическим **стрессам**: патогенам, колебанию влажности, температуры и солености, тяжелым металлам.
- ◆ Гломусовые грибы выделяют белок **гломалин**, что способствует образованию почвенных агрегатов и **препятствует эрозии**.
- ◆ Практических данных об успешности подобных предприятий пока мало.

Микроклональное размножение растений

- ◆ У клональных растений *in vitro* слабо развита корневая система, ослаблен иммунитет, тоньше листья, меньше хлорофилла
- ◆ Колонизация **смягчает акклиматизацию** клональных растений при высаживании в грунт
- ◆ **Есть данные** по улучшению приживаемости клональных саженцев *Olea europaea*, *Punica granatum*, *Citrus limon*

- ◆ ЭМ особенно полезны, так как клональные **голосеменные растения** особенно подвержены **стрессу**.

Фундаментальные исследования

- ◆ Вероятно – **главное применение** моноксеничных культур
- ◆ Изучение транспортных процессов
- ◆ Изучение физиологии микоризообразующих грибов
- ◆ Изучение морфологии мицелия
- ◆ Изучение морфологии и цитологии микориз
- ◆ Пространство для применения молекулярных методов
- ◆ *In vitro* **коллекции** микоризообразующих грибов связывают микоризологов из разных исследовательских групп, облегчают исследования и задают стандарт качества культур.



**Благодарю за
внимание!**