
БИОТИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

М.И. Яблонская, М.С. Гинс,
М.А. Молчанова

Агробиотехнологический департамент
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

Использование симбиотических микроорганизмов при клональном микроразмножении повышает устойчивость растений к негативным биотическим и абиотическим факторам. Биотизация растений подразумевает собой использование в качестве инокулюма пропагул симбиотических бактерий (бактеризация) и грибов (микоризация) и является распространенным приемом при производстве клональных микрорастений в европейских странах. При размножении *in vitro* этап акклиматизации считается критическим и происходит массовая гибель растений, в связи с чем использование приема биотизации поможет повысить выживаемость растений и является перспективным методом при клональном микроразмножении.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, микоризация, бактеризация, акклиматизация.

Метод клонального микроразмножения растений существенно отличается от традиционных технологий своей скоростью и высоким коэффициентом размножения, а также возможностью получения однородного безвирусного посадочного материала. Многие виды растений успешно размножаются в культуре *in vitro*, особенно этот метод актуален для хвойных пород растений, трудно размножаемых традиционными способами.

Но, несмотря на все преимущества метода, существует проблема перевода пробирочных растений в нестерильные условия, когда после пересадки в почву наблюдается массовая гибель растений. Прежде всего это связано с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата и листья имеют сниженное количество кутикулярного воска, вследствие чего происходит чрезмерная потеря воды [1]. Сразу после пересадки *ex vitro* корни таких растений имеют сильно пониженную способность всасывать воду и минеральные вещества, т.е. корневая система растений, полученных *in vitro*, практически нежизнеспособна и часто отмирает. Водный стресс также является одной из немаловажных причин гибели растений-регенерантов при клональном микроразмножении.

При промышленном производстве посадочного материала главной проблемой остается низкий процент выживаемости на этапе акклиматизации и слабый рост адаптированных микрорастений после высадки в открытый грунт. Улучшить минеральное питание и повысить устойчивость растений к водному стрессу может использование симбиотических микроорганизмов, присутствующих в естественных условиях произрастания.

Большинство видов наземных растений (80—90%) способно к симбиотическому взаимодействию с грибами отдела *Glomeromycota*, с представителями которого растения образуют арбускулярную микоризу (АМ) [2]. Образую симбиоз с корнями растений, гифы гриба увеличивают площадь всасывания корневой сис-

темы, благодаря чему в несколько раз повышается всасывающая способность, а соединения минеральных веществ поступают внутрь корня в легкоусвояемой форме. Арбускулярная микориза является самой изученной формой эндомикоризы.

АМ-грибы распространены повсеместно, они хорошо развиваются в широком диапазоне кислотности почвы, температуры, влажности и аэрации. Важной особенностью арбускулярных микоризных грибов является способность одного и того же вида эндомикоризного гриба вступать в симбиотические отношения с большим числом видов растений.

В основном образование эндомикоризы для АМ-грибов является облигатной стадией жизненного цикла, вне растения они существуют в форме покоящихся спор. Для прохождения жизненного цикла растений АМ-симбиоз не является обязательным, но необходим для выживания в типичных для них экологических условиях. Особенно важен этот симбиоз для древесно-кустарниковых форм, а также для растений со слабо развитой системой корневых волосков.

Арбускулярная микориза оказывает общестимулирующее действие на растения, увеличивает активность фотосинтеза, улучшает водный статус и минеральное питание, влияет на фитогормональный статус, повышает устойчивость растений к патогенам, в результате чего возрастает их продуктивность. АМ-грибы способствуют переводу питательных веществ, в особенности фосфора и микроэлементов, в формы, доступные для растений. По результатам исследований I. Jakobsen, через арбускулу АМ-гриб получает от растения-хозяина углеводы в виде гексозы [3]. Таким образом, симбиоз с полезными для растений почвенными микроорганизмами, такими как АМ-грибы, предоставляет им дополнительные возможности для выживания в различных условиях, а микросимбионтам — продукты фотосинтеза и экологическую нишу.

На эффективность симбиоза оказывает влияние содержание питательных элементов в почве. Присутствие в субстрате повышенных доз минеральных веществ зачастую снижает продуктивность АМ-симбиоза, в то время как при пониженном минеральном питании эффект от микоризации размножаемых растений значительно увеличивается [4].

Однако эффективность АМ-симбиоза зависит не только от содержания минеральных компонентов в почве, но и от вида и штамма арбускулярного микоризного гриба, отзывчивости растения на инокуляцию эндомикоризным грибом (симбиотической эффективности растения) и плотности инокуляционного материала в субстрате [4].

Немало исследований проводилось по вопросу микоризации таких растений, как сосна, береза, тополь, дуб, эвкалипт, грецкий орех, каштан, банан, гуава, малина, земляника, перец, фикус Бенджамина и виноград, по результатам которых отмечалось увеличение скорости роста и снижение потерь микрорастений на этапе акклиматизации.

Техника инокуляции арбускулярных микоризных грибов зависит от используемого субстрата, штаммов гриба, стадии развития размножаемого растения и должна быть разработана для конкретного вида растения. В качестве исходного

инокуляционного материала используют стерильные мицелий, споры, хламидоспоры и микоризованные корни, которые помещают около корней растений *in vitro*. Чтобы стимулировать формирование микоризы, среда для культивирования микоризованных растений должна содержать пониженное количество сахара и минеральных веществ, также необходимо обеспечить достаточное количество CO_2 , необходимое для автотрофного питания растений.

В работах по микоризации *Prunus cerasifera* АМ-грибами *Glomus mosseae* и *G. coronatum* отмечалась 100%-ая выживаемость микрорастений после пересадки в нестерильные условия [5]. При микоризации *Triticum durum* в полевых условиях штаммами *Glomus mosseae* скорость роста растений увеличилась в 11,6 раз, а урожайность возросла больше, чем в 5 раз [6].

По данным других исследований, использование разных штаммов эндомикоризных грибов не оказало существенного влияния на скорость и процент укореняемости различных сортов *Rhododendron*, но вызвало значительное увеличение роста растений в условиях *ex vitro* [7]. Nowak установил, что в условиях *in vitro* в присутствии полезных почвенных микроорганизмов происходят некоторые изменения в развитии и метаболизме растений, в результате чего увеличивается устойчивость к биотическим и абиотическим факторам, вызывающим стресс [8].

Ризосфера является динамичной средой, где микроорганизмы подвержены влиянию корневых экссудатов, а также взаимодействуют не только с растением, но и друг с другом [10]. Арбускулярные микоризные грибы модифицируют окружающую среду, формируя так называемую микоризосферу [10]. Положительное влияние АМ-грибов усиливается в присутствии других полезных микроорганизмов, стимулирующих рост растений.

**Виды АМ-грибов, используемых для инокуляции
некоторых видов растений *in vitro* [9]**

<i>Glomus epigaeum</i>	Яблоня
<i>Glomus fasciculatum</i> , <i>G. caledonium</i> , <i>G. monosporum</i> , <i>G. constrictum</i> , <i>G. occultum</i> , <i>G. vesiforme</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Gigaspora margarita</i>	Киви (<i>Actinidia deliciosa</i>), Виноградная лоза (<i>Vitis sp.</i>)
<i>Glomus aggregatum</i> , <i>G. deserticola</i>	Черешня (<i>Prunus avium</i>), Спирея (<i>Spiraea vulgaris</i>), Сирень (<i>Syringa japonica</i>)
<i>Glomus fasciculatum</i> , <i>G. intraradices</i>	Финиковая пальма (<i>Phoenix dactylifera</i>)
<i>Glomus mosseae</i> , <i>G. coronatum</i> , <i>G. caledonium</i>	Алыча (<i>Prunus cerasifera</i>)
<i>Glomus intraradices</i> , <i>G. geosporum</i>	Земляника (<i>Fragaria ananassa</i>)
<i>Glomus intraradices</i> , <i>G. macrocarpum</i> , <i>G. mosseae</i>	Земляника (<i>Fragaria ananassa</i> , <i>F. virginiana</i> , <i>F. vesca</i>)
<i>Glomus intraradices</i> , <i>G. fasciculatum</i> , <i>G. caledonium</i> , <i>G. monosporum</i>	Черешня (<i>Prunus avium</i>)

Помимо микоризации при размножении растений для повышения их жизнедеятельности используют также симбиотические бактерии. Метод бактеризации

не уступает по эффективности при клональном микроразмножении. Как и при микоризации, симбиотические бактерии развиваются на питательной среде только в присутствии растения и не требуют повторной инокуляции. Бактерии рода *Pseudomonas* стимулируют рост растений *in vitro*, улучшают водный обмен, минеральное питание, а также повышают устойчивость к патогенным организмам при пересадке. Для бактеризации чаще используются ростостимулирующие бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter* и другие. Заражение растений можно проводить как *in vitro*, так и *ex vitro*.

Жизнедеятельность эндомикоризных грибов тесно связана с симбиотическими бактериями, которые могут стимулировать рост АМ-грибов на пресимбиотической стадии развития, предшествующей установлению непосредственного контакта микросимбионта с корнем растения [10]. Существуют данные о том, что штаммы *Bacillus mycoides* и *Pseudomonas fluorescens* способствуют более быстрой микоризации, повышая восприимчивость корней растений к АМ-симбиозу [11]. Также было доказано, что при совместной инокуляции *Glomus mosseae* и *Pseudomonas fluorescens* увеличивалась интенсивность роста растений томата и повышалась устойчивость к галлообразующим нематодам по сравнению с инокуляцией микроорганизмов по отдельности [12].

Исследования влияния микросимбионтов на размножаемые *in vitro* растения продолжаются в отношении широкого спектра культур, поскольку в целом биотизация оказывает положительное действие на микрорастения. Использование ростостимулирующих бактерий увеличивает эффективность АМ-симбиоза с растениями-регенерантами, снижая стресс пробирочных растений при переносе в нестерильные условия на этапе акклиматизации. Все это позволяет говорить не только о необходимости использования симбиотических микроорганизмов, но и о перспективности создания многокомпонентных симбиозов.

Данное научное исследование проводится при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК» в рамках договора № 5936 от 11 июня 2015 года.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Yildiz A., Cagdas A., Aslihan A., Yesim Y., Sedat S., Ibrahim O. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization // *Romanian Biotechnological Letters*. 2010. Vol. 15. № 3. P. 5246—5252.
- [2] Schüßler A., Schwarzott D. Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // *Mycol. Res*. 2001. Vol. 105. P. 1413—1297.
- [3] Jakobsen I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhiza // *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, and biotechnology*. 2nd ed. Berlin: Springer, 1999. P. 305—332.
- [4] Bhuiyan M.A.H. Effect of rate of arbuscular mycorrhiza inoculum on Tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Bangladesh J. Agril. Res.*, 2013. 38(3): 473—480.
- [5] Fortuna P., Citeresi S., Morini S., Giovannetti M., Loreti F. Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S2/5 plum rootstock. *Agronomie*, 1992. 12:825—830.
- [6] Karagiannidis N., Hadjisavva-Zinoviadi S. The mycorrhizal fungus *Glomus* enhances growth, yield, and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 1998. 52:1—7.

- [7] Eccher T., Martinelli M. Inoculation of *Rhododendron* cultivars in vitro with different strains of ericoid endomycorrhizae. *Acta Hort.*, 2010. 865:327—332.
- [8] Nowak J. Benefits of in vitro biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 1998. 34:122—130.
- [9] Rai M.K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 2001. — 37:158—167.
- [10] Barea J.-M., Pozo M.-J., Azcon R., Azcon-Aguilar C. Microbial cooperation in the rhizosphere // *J. Exp. Botany*. Vol. 56, N. 14, 2005. P. 1761—1788.
- [11] Von A. State of commercial use of AMF-inoculum in Germany. In: Gianinazzi S.; Schuepp H., eds. *Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. Report of 1997 activities, Cost Action 821, Iceland 153*, 1998.
- [12] Siddiqui Z.A., Mahmood I. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Appl. Soil Ecol.*, 1998. 8:77—84.

IN VITRO BIOTIZATION

**M.I. Yablonskaya, M.S. Gins,
M.A. Molchanova**

Agrobiotechnologies Department
Peoples' Friendship University of Russia
Miklucho-Maklay str., 8/9, Moscow, Russia, 117198

In vitro coculture of plant tissue explants with beneficial microorganisms enhance their tolerance to abiotic and biotic stresses. The induced resistance response caused by the inoculants is referred to as “biotization”. There is enough experimental evidence with bacteria (bacterization) and vesicular arbuscular mycorrhiza (mycorrhization) inoculations to recommend utilization of this technology in commercial micropropagation. Micropropagated plantlets usually exhibit high mortality rate upon their transfer to soil, so biotization technique can improve survival and is considered to be a perspective method in clonal micropropagation.

Key words: clonal micropropagation, micorrhization, bacterization, acclimatization.

REFERENCES

- [1] Yildiz A., Cagdas A., Aslihan A., Yesim Y., Sedat S., Ibrahim O. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. *Romanian Biotechnological Letters*. 2010. Vol. 15. N 3. P. 5246—5252.
- [2] Schüßler A., Schwarzott D. Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 2001. Vol. 105. P. 1413—1297.
- [3] Jakobsen I. Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology, and biotechnology*. 2nd ed. Berlin: Springer, 1999. P. 305—332.
- [4] Bhuiyan M.A.H. Effect of rate of arbuscular mycorrhiza inoculum on Tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. *Bangladesh J. Agril. Res.*, 2013. 38(3): 473—480.
- [5] Fortuna P., Citernesi S., Morini S., Giovannetti M., Loreti F. Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S2/5 plum rootstock. *Agronomie*, 1992. 12:825—830.

- [6] Karagiannidis N., Hadjisavva-Zinoviadi S. The mycorrhizal fungus *Glomus* enhances growth, yield, and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.*, 1998. 52:1—7.
- [7] Eccher T. and Martinelli M. Inoculation of *Rhododendron* cultivars in vitro with different strains of ericoid endomycorrhizae. *Acta Hort.*, 2010. 865:327—332.
- [8] Nowak J. Benefits of in vitro biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 1998. 34:122—130.
- [9] Rai M.K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. In *Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 2001. 37:158—167.
- [10] Barea J.-M., Pozo M.-J., Azcon R., Azcon-Aguilar C. Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Botany*. 2005. Vol. 56, N. 14. P. 1761—1788.
- [11] Von A. State of commercial use of AMF-inoculum in Germany. In: Gianinazzi S., Schuepp H., eds. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. Report of 1997 activities, Cost Action 821, Iceland 153, 1998.
- [12] Siddiqui Z.A., Mahmood I. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Appl. Soil Ecol.*, 1998. 8:77—84.