

**ОТРИМАННЯ ТА ВИПРОБУВАННЯ ІНОКУЛЯТІВ АРБУСКУЛЯРНИХ
МІКОРИЗНИХ ГРИБІВ З МЕТОЮ МОДИФІКАЦІЇ ПОГЛИНАННЯ
РАДІОНУКЛІДІВ РОСЛИНАМИ****А. В. Крїпка, Б. В. Сорочинський***Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ*

З метою отримати ефективні штами арбускулярних мікоризних (АМ) грибів, що здатні модифікувати поглинання радіонуклідів рослинами, було виділено спори АМ грибів з ризосфери рослин із зони відчуження ЧАЕС, що мали найбільші показники накопичення радіонуклідів та високий рівень колонізації АМ грибами. Спори було класифіковано за морфологічними та молекулярними показниками. Отримано три види інокуляту АМ грибів, при використанні яких в експериментах з фітореMediaції досягнуто високі коефіцієнти поглинання ^{90}Sr та ^{137}Cs .

Функціонування та стабільність наземних екосистем визначається біорозмаїттям рослин та їх видовим складом. Водночас різноманітність рослинності, продуктивність та варіабельність екосистем визначається розмаїттям їх мікоризних грибів [1]. Ризосфера переважної більшості деревовидних та трав'янистих рослин є складним симбіотичним утворенням між кореневою системою самих рослин та ґрунтовими організмами, насамперед бактеріями та мікоризними грибами. Мікоризні гриби, що живуть у поверхневому шарі кореневої системи, забезпечують додатковий фізичний контакт між кореневою системою та ґрунтовим комплексом і збільшують, отже, загальну площу, з якої рослина поглинає мікроелементи та воду. Найбільш поширеними формами симбіозу рослин з грибами є екзомікоризи, що формуються переважно деревовидними рослинами з базидіоміцетами, та ендомікоризи, що формуються, насамперед, трав'янистими рослинами з арбускулярними мікоризними (АМ) грибами [2]. Більше ніж 80 % видів як диких, так і культивованих трав'янистих рослин можуть вступати в симбіоз з АМ грибами [2, 3], до яких належать гриби з класу *Zygomycetes* і для яких характерною є здатність утворювати арбускули та везикули всередині кортикальних клітин кореневої системи рослин.

АМ гриби зустрічаються в різноманітних кліматичних зонах і на різних ґрунтах, включаючи ґрунти, що забруднені відходами промислових виробництв та радіоактивними ізотопами. Важлива роль арбускулярних мікориз полягає в поліпшенні росту рослин, підвищенні їх життєздатності, а також здатності акумулювати мікроелементи [3]. Остання обставина обумовила використання АМ грибів у технології фітореMediaції важких металів [4]. Технології фітореMediaції базуються на здатності окремих видів рослин, так званих рослин-гіперакумулятивів, накопичувати у великій кількості певні хімічні елементи. На жаль, можливості фітореMediaції суттєво обмежені низькою біодоступністю більшості поллютантів, оскільки значна частина з них знаходиться в ґрунтовому комплексі в сильно фіксованих формах. Тому для підвищення ефективності фітореMediaції суттєвим є вирішення питання про збільшення кількості мобільних (потенційно біодоступних) форм токсичних елементів у ґрунтовому комплексі.

Що стосується питання про можливість використання мікоризних грибів з метою модифікації вмісту радіонуклідів у рослинах, то отримані результати не є однозначними, оскільки в літературі описано як збільшення вмісту окремих радіонуклідів у тканинах рослин після їх обробки АМ чи ендомікоризними (ЕМ) грибами, так і зменшення рівня радіоактивності в рослинних тканинах [5, 6]. Водночас варто відмітити, що ізоляти АМ чи ЕМ грибів, що їх використовували в експериментах для модифікації нагромадження радіонуклідів рослинами, було отримано з ризосфери рослин переважно на ґрунтах з високим вмістом важких металів. Отже, ці ізоляти АМ та ЕМ грибів не обов'язково повинні мати певну активність стосовно до радіонуклідів.

З метою отримати штами АМ грибів, здатних впливати на поглинання радіонуклідів рослинами, ми проаналізували більше 30 різних видів рослин із зони відчуження ЧАЕС та відібрали зразки, що мали високі показники поглинання ^{90}Sr та ^{137}Cs і характеризувалися водночас високим рівнем колонізації АМ грибами [7]. З ризосфери цих рослин було виділено спори АМ грибів, які використали для продукування інокулуму ізолятів АМ грибів-модифікаторів поглинання радіонуклідів. У цій статті наводяться результати експериментів з модифікації поглинальної здатності експериментальних рослин за допомогою отриманих нами препаратів АМ грибів.

Матеріали та методи

Рівень колонізації рослин АМ грибами визначали під мікроскопом після фарбування корінців лактофенолом голубим [8].

Спори АМ грибів виділяли з кореневої системи відібраних рослин, просіваючи ґрунт через сита з діаметром пор 500, 80 та 40 мкм. Відбирали матеріал, що знаходився на ситах з діаметрами пор 80 та 40 мкм [8].

Продукування інокулуму здійснювали за допомогою рослин чорнобривців (*Tegetes patulus*), які вирощували протягом 80 діб у пластмасових горщиках, наповнених сумішшю торфу з перлітом (1 : 8), в яку вносили виділені спори АМ грибів.

Ідентифікацію спор здійснювали за морфометричними показниками [2] та за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR). Для цього одну - три спори певного морфотипу роздавлювали скляною паличкою та переводили в 5 мкл реакційної суміші для PCR. Ампліфікацію проводили в реакційній суміші (25 мкл), що містила 50 нг ДНК, по 0,2 мкм розчину кожного з праймерів, 2,0 од. акт. *Taq* ДНК полімерази (Sigma, США), 2,5 мкл 10-кратного буфера для ферменту (Promega, США), 0,1 мМ кожного з dNTP (Perkin Elmer, США) та 2,5 мМ MgCl_2 (Promega, США). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» (Росія). Денатурацію ДНК здійснювали при 94 °С протягом 1,5 хв, після чого проводили п'ять циклів ампліфікації в режимі 94 °С - 10 с, 68 °С - 10 с, 72 °С - 20 с, та 40 циклів ампліфікації в режимі 94 °С - 5 с, 68 °С - 5 с, 72 °С - 5 с та завершували ампліфікацію при 72 °С протягом 5 хв. Електрофорез отриманих продуктів ампліфікації здійснювали в 1,7 %-ному агарозному гелі (Chemarol, Чехія) при 45 В/199 мА протягом 40 хв. Як маркери молекулярної ваги використовували набір маркерів молекулярної ваги від 100 до 3000 пар нуклеотидів (Gene Ruler 100 bp DNA ladder plus, MBI Fermentas, Литва).

Експерименти для вивчення впливу АМ грибів на надходження радіонуклідів у рослини проводили із зразками ґрунту, відібраними в зоні відчуження ЧАЕС на околиці Чорнобиля (рН ґрунту 5,5; вміст глини 12 %, вміст органічних речовин 2,0 %, концентрація ^{137}Cs 2070 Бк/кг, концентрація ^{90}Sr 1100 Бк/кг). Зразки ґрунту відбирали з шару товщиною 10 - 15 см, просівали через сито (< 6 мм) та перемішували з інокулумом (9 : 1). Експерименти проводили з рослинами чорнобривців як рослиною-господарем. Рослини вирощували в пластикових горщиках (2 л) у закритому приміщенні при природному освітленні.

Вимірювання радіоактивності в сухих зразках рослин та ґрунту здійснювали в Чорнобильському науково-технічному центрі міжнародних досліджень МНС України на гамма-спектрометрі Canberra (США).

Результати та обговорення

АМ гриби зустрічалися в кореневій системі не в усіх відібраних нами рослинах; рівень колонізації АМ грибами для проаналізованих рослин знаходився в межах від 0 до 98,7 % [7]. Зокрема, АМ гриби практично не зустрічалися в ризосфері рослин, відібраних у «Рудому» лісі. Відомо, що рівень колонізації рослин АМ грибами залежить від рН ґрунту, вмісту органічних речовин, складу катіонів й аніонів та деяких інших показників [9]. Оскільки у «Рудому» лісі переважають ґрунти з кислим рН [10], то це може бути однією з причин низької колонізації рослин АМ грибами. До рослин з високим рівнем колонізації

можна віднести подорожник *Plantago major* (рівень колонізації від 68,3 до 98,7 %); звіробій *Hypericum perforatum* (рівень колонізації від 32,0 до 87,3 %); конюшину *Trifolium repens* (рівень колонізації від 6,0 до 91,6 %) і скереду *Crepis tectorum* (рівень колонізації від 46,6 до 86,0 %). На рис. 1 наведено зразки кореневої системи різних рослин, колонізованих АМ грибами.

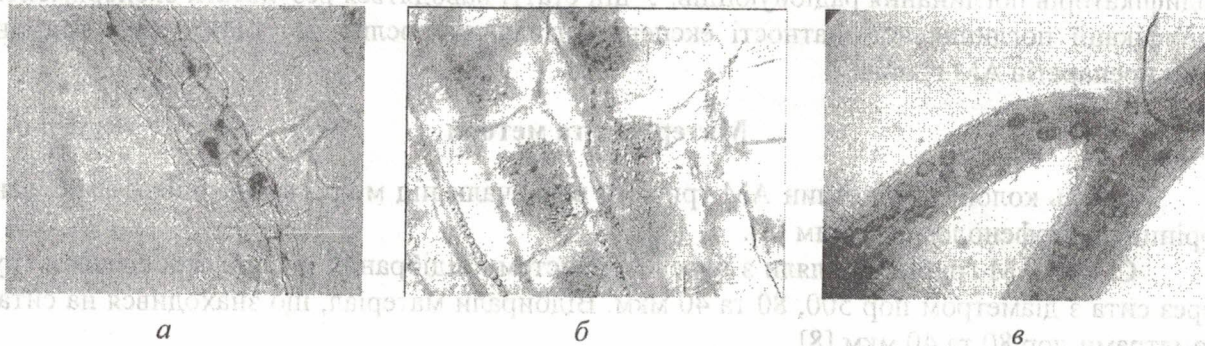


Рис. 1. Коріння рослин з Чорнобильської зони, колонізованих АМ грибами:
а – *Hypericum perforatum*; б – *Crepis tectorum*; в – *Plantago major*.

Для всіх зразків рослин було визначено коефіцієнти накопичення ^{137}Cs і ^{90}Sr , виходячи з того, що коефіцієнт накопичення радіонуклідів (Кн) є відношенням питомої радіоактивності в рослині до питомої радіоактивності в ґрунті. Високі показники Кн ^{137}Cs було встановлено для деяких із рослин звіробою (Кн = 5,2), а стосовно до ^{90}Sr - для подорожника (Кн = 30,7), конюшини (Кн = 20,0) і скереди (Кн = 93,8).

З ризосфери рослин звіробою, подорожника та скереди, що мали великі показники Кн, нами було виділено спори АМ грибів. Спори аналізували за допомогою біокуляра, при цьому розрізняли спори лимонного, жовтого та білого кольорів, діаметр спор був 50 - 120 μm . За морфологічними ознаками (розмір, колір, форма) виділені нами спори можна віднести до роду *Glomus* [1]. Подальшу ідентифікацію спор АМ проводили за допомогою PCR-аналізу, використовуючи специфічні олігонуклеотидні праймери. Використовували ITS1 та ITS4 праймери, що є комплементарними до рибосомального внутрішнього транскрибуючого спейсера. Регіони ITS являють собою консервативні послідовності, що мають високу видоспецифічність. Завдяки високій багатокопійності їх зручно використовувати для ампліфікації одиничного гена. Таким чином, ITS послідовності є оптимальними для вибору праймерів для PCR-діагностики АМ грибів. На рис. 2 наведено результати електрофорезу препаратів спор, виділених із ризосфери рослин скереди, після PCR-тестування. ITS послідовності тестуються в геномі спор; отримані продукти ампліфікації 560 пар нуклеотидів свідчать про те, що дані спори належать до АМ грибів роду *Glomus* [11].

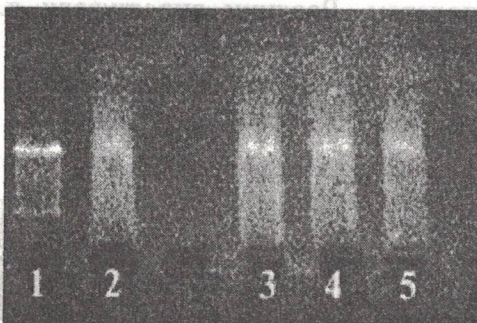


Рис. 2. PCR аналіз із специфічними праймерами (ITS1 та ITS4) ДНК зі спор, виділених з ризосфери *Crepis tectorum*:
1 – маркери МВ; 2 – жовта спора; 3 – біла спора; 4 – велика жовта спора, 5 – жовта спора.

У табл. 1 наведено інформацію про рівень колонізації рослин, інфікованих отриманими нами інокулятами АМ грибів. Високий рівень колонізації експериментальних рослин свідчить про потенційно високу інфекційну здатність отриманого інокуляту.

Таблиця 1. Колонізація експериментальних рослин *Tagetes patulus* ендегенними чорнобильськими штамами АМ грибів

Опис	Дата	F, %	M, %	A, %	A, %
Інокулят 1	08.07.02	73,33	5,33	65,94	3,52
	23.07.02	76,67	37,67	96,90	36,50
Інокулят 2	08.07.02	86,67	22,77	94,52	21,52
	23.07.02	95,56	57,24	79,63	46,50
Інокулят 3	08.07.02	76,67	23,53	97,18	22,87
	23.07.02	94,00	32,50	93,74	30,34

Примітка. F - частота колонізації, M - інтенсивність колонізації, A - процентний вміст арбускул у колонізованому корінні, а - процентний вміст арбускул у кореневій системі; інокулят 1 - спори, ізолювані з ризосфери *Plantago major*, інокулят 2 - спори, ізолювані з ризосфери *Hypericum perforatum*, інокулят 3 - спори, ізолювані з ризосфери *Crepis tectorum*.

Здатність отриманого інокуляту АМ грибів модифікувати поглинання радіонуклідів рослинами перевіряли в лабораторних умовах, отримані результати наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Вплив передпосівної інокуляції рослин *Tagetes patulus* різними штамами АМ грибів на вміст радіонуклідів протягом сезону вегетації

Варіант досліду	Дата аналізу	Рівень колонізації рослин АМ грибами, %	Радіоактивність у надземній частині рослин, Бк/кг		Кн	
			¹³⁷ Cs	⁹⁰ Sr	¹³⁷ Cs	⁹⁰ Sr
Контроль	08.07.02	1,66	370	8900	0,2	7,5
	23.07.02	0	365	9850	0,18	8,3
Інокулят 1	08.07.02	73,33	900	18000	0,7	15,3
	23.07.02	76,67	1200	21000	0,9	17,8
Інокулят 2	08.07.02	86,67	2800	6000	2,0	5,1
	23.07.02	95,56	3500	6300	2,6	5,3
Інокулят 3	08.07.02	76,67	2040	26000	1,0	22,0
	23.07.02	94,00	2300	30000	1,3	25,4

Результати свідчать, що інокулят можна успішно використати в експериментах з модифікації поглинальної здатності рослин, оскільки отримано досить високі рівні поглинання ¹³⁷Cs (інокулят 2) та ⁹⁰Sr (інокулят 1 та інокулят 3). Отримані в цих експериментах Кн є суттєво вищими від коефіцієнтів, встановлених у лабораторних умовах для рослин *Tagetes patulus* за умови використання іншого інокуляту АМ грибів [12].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Masrcel G.A., van der Heijden et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity // Nature. - 1999.- Vol. 396. - P.69 - 72.
2. Harley J.L., Smith S.E. Mycorrhizal symbiosis. - London: Acad. Press, 1983.
3. Harrison M.J. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis // Current Option in Plant Biology. - 1998. - No. 1. - P. 360 - 365.
4. Del Val C., Barea J.M. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus population in heavy-metal-contaminated soil // Applied and Environmental Microbiology. - 1999. - No. 2 - P. 718 - 723.
5. Gadd G.M. Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides // Endeavour. - 1996. -Vol. 20, No. 4 - P. 150 - 156.
6. Berreck M., Hazelwandter K. Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis upon uptake of cesium and other cations by plants // Mycorrhiza. - 2001. - No. 10 - P. 275 - 280.
7. Крипка А.В., Сорочинский Б.В., Кучма А.Н. Арбускулярные микоризные грибы из зоны отчуждения ЧАЭС и их возможная роль в поступлении радионуклидов в растения // Збірник наукових праць Інституту ядерних досліджень. - 2002. - № 2(8). - С. 140 - 144.

8. *Giovannetti M., Mosse B.* An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular in roots // *New Phytol.* – 1980 – No. 84. - P. 489 - 500.
9. *Weissenhorn I., Leyval C., Belgy G., Berthelin J.* Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. // *Mycorrhiza.* – 1995. – No. 5 - P. 245 - 251.
10. *Кучма Н.Д., Подкур П.П., Чернявский Н.В.* Особенности лесовосстановления на дезактивированных площадях зоны ЧАЭС // *Лесоводство и агролесомелиорация.* – 1990. - № 81. - С. 18 - 22.
11. *Abbas J.D., Hetrick V.A.D., Jugenson J.E.* Isolate specific detection of mycorrhizas fungi using genome specific primer pairs // *Mycologia.* - 1996. – No. 88. - P. 939 - 46.
12. *Сорочинский Б.В., Крипка А.В., К.В. Годована К.В та ін.* Вплив арбускулярних мікоризних грибів на поглинання рослинами радіостронцію та радіоцезію // *Доп. НАН України.* – 2002. - № 12. - С. 146 - 149.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПЫТАНИЕ ИНОКУЛЯТОВ АРБУСКУЛЯРНЫХ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ С ЦЕЛЬЮ МОДИФИКАЦИИ ПОГЛОЩЕНИЯ РАДИОНУКЛИДОВ РАСТЕНИЯМИ

А. В. Крипка, Б. В. Сорочинский

С целью получить эффективные штаммы арбускулярных микоризных (AM) грибов, способных модифицировать поглощение радионуклидов растениями, были выделены споры AM грибов из ризосферы растений из зоны отчуждения ЧАЭС с наибольшими показателями накопления радионуклидов и высоким уровнем колонизации AM грибами. Споры были классифицированы по морфологическим и молекулярным показателям. Получено три вида инокулята AM грибов, при использовании которых в экспериментах по фиторемедиации получены высокие коэффициенты поглощения ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs

OBTAINING AND TESTING OF THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGIES INOCULA FOR THE MODIFICATION OF RADIONUCLIDES TRANSPORT INTO THE PLANTS

A. V. Kripka, B. V. Sorochinsky

Spores of the arbuscular mycorrhizal (AM) fungies have been isolaten from the plants collected at the Chernobyl zone. Selection of the plants were done due to their high radionuclides' accumulation ability and AM colonization level as well. These spores were used to start the inocula production for the plant treatment aimed to affect radionuclides trasport. Spores identification was done based on their morphological and molecular features. Three differen AM inocula with high potential to modify ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs transport at the phytoremediation experiments were obtained.

Надійшла до редакції 24.03.03,
після доопрацювання – 26.06.03.