

Endomikorrhiza gombák izolálása kukorica alól csernozjom talajon

SZÉCSI ÁRPÁD, KÁDÁR IMRE és SZÁNTÓ MÁRIA

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató
Intézete és Erdészeti Tudományos Intézet, Budapest

Intenzív kutatások folynak világszerte annak érdekében, hogy a magasabb rendű növényekkel szimbiózisban élő endomikorrhiza gombákat /*Endogonaceae*, *Zygomycetes*/ felhasználják a növénytermesztésben /JEFFRIES, 1987/.

Ezeknek a gombáknak a gombafonalai /hifái/ részben a gyökér felületén találhatóak. részben behatolnak a gazdanövény sejtjeibe, s ott jellegzetes hólyagszerű kiszélesedéseket - ún. vezikulumokat -, valamint villásan elágazó, fa alakú arbuszkulumokat - hifa gombolyagokat - alkotnak. A fenti morfológiai jellemzők alapján a szakirodalomban vezikuláris-arbuszkuláris mikorrhiza /VAM/ gombáknak is nevezik őket. Az endomikorrhiza gombák a talajból felveszik és a gyökérsejteknek átadják a fontos tápanyagokat - elsősorban a foszfort és a nitrogént - s ezért cserébe a gazdanövény által feldolgozott tápanyagokból elsősorban cukrokat, vitaminokat és más szerves anyagokat kapnak /HARLEY és SMITH, 1983/.

Az endomikorrhiza gombák az egész Földön elterjedtek, szinte minden virágos növény gyökerén megtalálhatóak. A termesztett növények közül a szántóföldi növények /pl. gabonafélék stb./, zöldségfélék, gyümölcsfák és a szőlő esetében jelentős szerepük van. Ezek a gombák táptalajokon nem tenyésztethetők. Elszaporításuk úgy történik, hogy a talajban található spóráikat /azigospóra, klamidospóra/ izoláljuk és a felületileg sterilizált spórával /vagy egytípusú spórákkal/ beoltjuk a tenyésztésükhöz cserépbe ültetett növények fertőtlenített talaját /SCHENCK, 1982/.

Az endomikorrhiza gombákkal végzendő mindennemű vizsgálat és kísérlet előfeltétele ezeknek a gombáknak az izolálása és meghatározása a vizsgálandó növénykultúra talajában és gyökérszférájában. Jelen munkánk célja megtalálni az endomikorrhiza gombák spóráinak izolálásához legegyszerűbb módszert, valamint meghatározni a morfológiailag különböző spóratípusokat - gomba nemzetségeket. Eddig ilyen típusú vizsgálatot tudomásunk szerint nem végeztek hazánkban.

Anyag és módszer

A mintavételi hely talajának jellemzése

A talajmintavételre az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete Nagy-
höröcsöki Kísérleti Telepén, egy 1977 őszén beállított kukorica monokultúra

műtrágyázási kísérletben került sor 1987-ben, a kukorica betakarítását követően. A 10 éve semmiféle trágyázásban nem részesült kontrollparcellákon 3 ismétlésben, 20-20 pontminta felhasználásával átlagmintákat vettünk a talaj felső 0-25 cm-es szántott rétegeből. A talajmintákat 30-40 °C-on szárítottuk, majd homogenizáltuk. A légszáraz, homogenizált minták szolgálták a talajlakó endomikorrhiza gombák spóráinak izolálására, valamint rutin agrókémiai vizsgálatok céljára is.

A löszön képződött mészlepedékes csernozjom talaj CaCO_3 -tartalma 5 %, humusztartalma 3% volt. Laboratóriumi vizsgálatok szerint a pH /KCl/ 7,4; AL- P_2O_5 - 80 ppm; AL- K_2O - 140 ppm; KCl-Mg- 120 ppm; EDTA-Mn- 150 ppm; EDTA-Zn- 2 ppm; EDTA-Cu-tartalom 3 ppm értéket mutatott. A hazánkban elfogadott módszerek és határértékek szerint a vizsgált talaj igen jó Mn-, kielégítő Mg- és Cu-, közepes N- és K-, valamint gyenge P- és Zn-ellátottságú. A kontrollparcellák átlagtermése 5-7 t/ha szemtermés körül ingadozott az elmúlt évtizedben.

Endomikorrhiza gombaspórák izolálásának módszerei

Talajlemez. - 1 g nedves talajt tettünk kémcsőbe, majd 9 ml desztillált vizet adtunk a mintákhoz. A lezárt kémcsöveket erősen rázogattuk 10 percig, majd ülepedni hagytuk 1 percig. A talajszuszpenzióból 1,0 ml-t pipettával 10 cm átmérőjű Petri-csészébe szűrőpapír korongra párhuzamos sorokba felvitünk. Egy almintát 50 db talajlemez képviselt. A talajlemezeken a spórákat sztereomikroszkóp alatt kerestük és bonctűvel izoláltuk.

Nedves szitálás. - A talajminták nedves szitálását GERDEMAN és NICOLSON /1963/ módszere alapján végeztük. 10 g talajmintát turmix keverőben 250 ml desztillált vízzel 10 percig kevertettünk. A talajszuszpenziót 1 percig ülepedni hagytuk, majd szitáló-rázógépben töltöttük. A szitáló-rázógép egy talajszita-sorozatból, egy rázógépből, valamint a szitasort lezáró vízporlasztófejet tartalmazó fedőrészből és a szitasorozat alján egy mosóvízgyűjtő és elvezető edényben állt. A szitasor pórusátmérője a következő volt: 1,0 mm; 250 μm ; 125 μm és 40 μm . A szitákon fennmaradt mosadékot /üledéket/ desztillált vízzel üveg dugós lombikokba mostuk, 10 percig rázogattuk, 1 percig ülepedni hagytuk, majd a spórákat szűrőmembránon gyűjtöttük /MILLNER, 1987/. A membránokon fennmaradt anyagot sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk, a spórákat vékony bonctűvel izoláltuk. Az izolált spórákat üvegfüzlőkben desztillált vízben 4 °C-on tartottuk a további feldolgozásig.

Cukorgrádiens centrifugálás. - A talajszuszpenziók készítése és a nedves szitálás megegyezik az előzőekben leírtakkal. A szitákon fennmaradt üledéket tovább tisztítottuk JENKINS /1964/ és OHMS /1957/ módszerének figyelembe vételével. Először a spórákat elválasztottuk a nedvesebb talajrészecskéktől, és törmelék szemcséktől, amikor is a desztillált vízben szuszpendált szitaüledékeket 3 percig centrifugáltuk 3000 fordulaton. A centrifugálás után a felülúszóban lévő spórákat megtisztítottuk a könnyű alakos részecskéktől. 10,0 ml 50 %-os szaharóz-oldatot töltöttünk 50,0 ml-es centrifugacsőbe, majd erre óvatosan 15,0 ml 25 %-os szaharóz-oldatot rétegeztünk és erre 10,0 ml desztillált vizet töltöttünk. Az így elkészített cukorgrádiens oszlopra a spórákat tartalmazó felülúszóból óvatosan 15,0 ml-t rétegeztünk. A grádiens 5 percig centrifugáltuk 3000 fordulaton. A spórák a 25 %-os szaharóz-oldatban gyűltek össze, amíg az alakos részecskék leülepedtek a centrifugacső aljára. A spórákat tartalmazó cukoroldatréteget fecskendővel kisivattuk és 40 μm pórusátmérőjű szitán mostuk, majd szűrővel összegyűjtöttük és feldolgoztuk.

Mikroszkópi vizsgálati módszerek. - A sztereomikroszkópi vizsgálatok során elkülönített spóratípusokból mikroszkópi preparátumokat készítettünk.

A spórákat lektofenolba ágyasztuk és Jénával mikroszkóppal különböző nagyságoknál vizsgáltuk és lefényképeztük. Az endomikorrhiza gomba nemzetségek meghatározását a spórák morfológiai bélyegei alapján HALL /1984/ útmutatásai szerint végeztük.

A kísérleti eredmények

Az egyes módszerekkel kapott spóraszámok adatai az 1. táblázatban láthatóak. A kipróbált endomikorrhiza gombaspóra izolálási módszerek közül a talajlemezek használatával több spórát izoláltunk, mint a többi módszer esetében /1. táblázat/. A talajlemez módszer azonban nagyon munka- és időigényes és csak olyan minták feldolgozásánál célszerű használni, ahol a talajban feltételezhetően magas a spóraszám.

1. táblázat

Endomikorrhiza gombaspórák /40 µm/ száma különböző izolálási módszereknél kukorica monokultúra talajában

/1/ Izolálási módszer	/2/ Spóra/gram nedves talaj /10 alminta átlagában/
a/ Talajlemez	85 ± 12
b/ Nedves szitálás	62 ± 10
c/ Cukorgrádiens centrifugálás	38 ± 18

A nedves szitálás módszerét akkor célszerű alkalmazni, ha minél kevesebb spóravesztéssel akarjuk meghatározni egy adott talajminta spóratartalmát, illetve minél több spóratípust szeretnénk izolálni. Vizsgálataink során a legtöbb spórát akkor kaptuk, amikor a talajszuszpenzió készítésénél az üledéket legalább még kétszer felszuszpendáltuk, turmixoltuk és az egyesített felülúszókat öntöttük a szitáló-rázógépbe. A szitákon /250 µm, 125 µm, 40 µm pórusátmérő/ fennmaradt üledékek vizsgálata során kiderült, hogy a 250 µm pórusátmérőjű szitán csupán a spórák 0,5-11 %-a maradt fent. Véleményünk szerint ez a szitátípus elhagyható a továbbiakban.

A cukorgrádiens centrifugálásos módszer kisebb hatékonysága /1. táblázat/ valószínűleg a spórák különböző ülepedési tulajdonságaival magyarázható, vagyis egyes spórák az üvegfalhoz tapadnak, mások úsznak, vagy leülepednek. Ezt a módszert akkor célszerű használni, ha erősen tisztított spóraanyag van szükségünk, így például az egyes spóratípusok mesterséges felzaporításához.

A kukorica alóli talajból izolált spórák mikroszkópi feldolgozása során számos, morfológiailag eltérő spóratípust mutattunk ki. A nedves szitálásos módszer, illetve annak kombinációja a cukorgrádiens centrifugálásos módszerrel legalább tíz spóratípus izolálását tette lehetővé. A spóratípusok meghatározását jelenleg is végezzük. A különböző nemzetségekbe tartozó spóratípusok morfológiai bélyegei alapján történő meghatározása - fajok kimutatása - folyamatban van. Az eddigi vizsgálatok alapján a következő nemzetségek képviselőit tudtuk azonosítani: *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus*. A nemzetségek elkülönítése egymástól viszonylag nem nehéz /HALL, 1984/

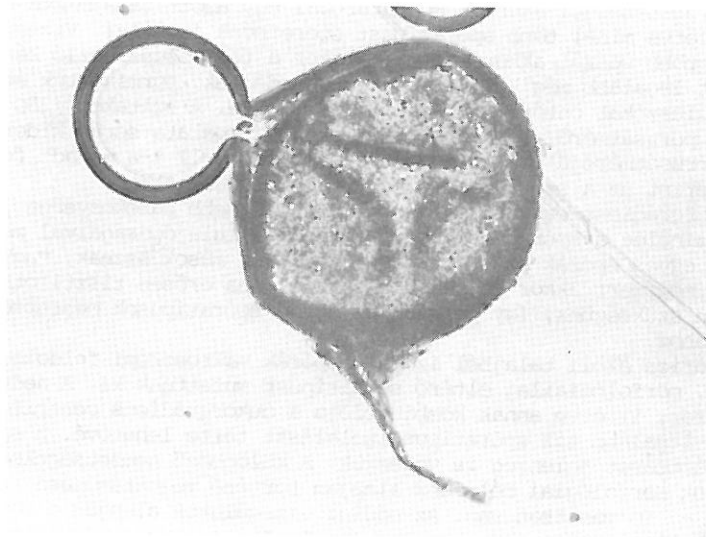
SCHENCK, 1982/, azonban az egyes nemzetségeken belül a fajok meghatározása csak nagyszámú összehasonlító anyag, típus anyag és kitartó munka eredményeként remélhető. Száz - találomra gyűjtött - spóra morfológiai meghatározása során az egyes nemzetségek számszerű megoszlását a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

Endomikorrhiza gombaspóra nemzetségek szerinti megoszlása kukorica monokultura talajában

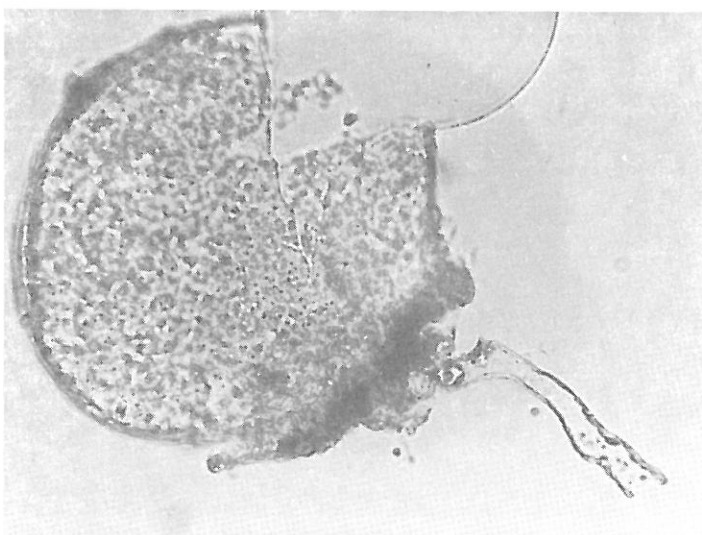
/1/ Spóratípus /nemzetség/	/2/ 100 spórából
Acaulospora	18
Gigaspora	26
Glomus	56

Az egyes nemzetségek képviselőit mikroszkópi fényképen mutatjuk be felhíva a figyelmet az esetlegesen látható nemzetségre jellemző morfológiai bélyegekre. Az 1. ábrán egy Acaulospora nemzetségbe tartozó endomikorrhiza gomba azigospórája látható. A Gigaspora nemzetség jellegzetes hifakapcsolódása alapján különíthető el más endomikorrhiza gomba nemzetségektől /2. és 3. ábra/. A 3. ábrán jól látható az azigospórához kapcsolódó hólyagszerű végződésű hifacsúcs, amely egy ponton ízesül a spórafalhoz. A Glomus nemzetségbe tartozó számos spóratípust találtunk /4., 5., 6., 7. és 8. ábra/. A



1. ábra

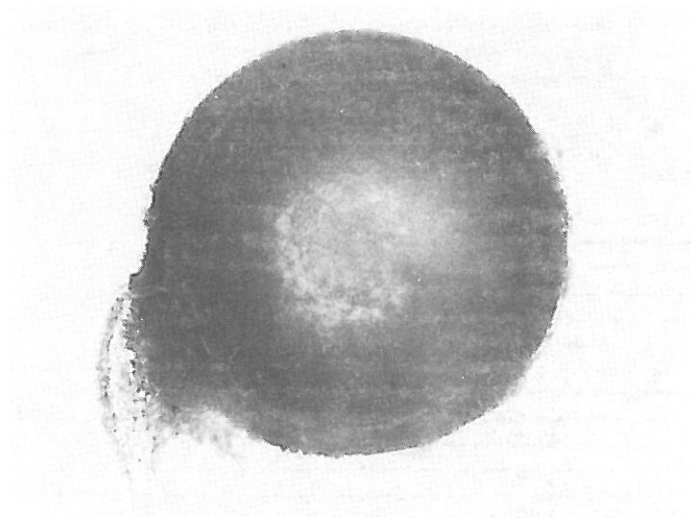
Acaulospora azigospórája hifacsatlakozással



2. ábra
Gigaspora nagy, kerek azigospórája hifacsatlakozással



3. ábra
A Gigaspora nemzetségre jellemző hifavég és annak kapcsolódása az azigospóra falához



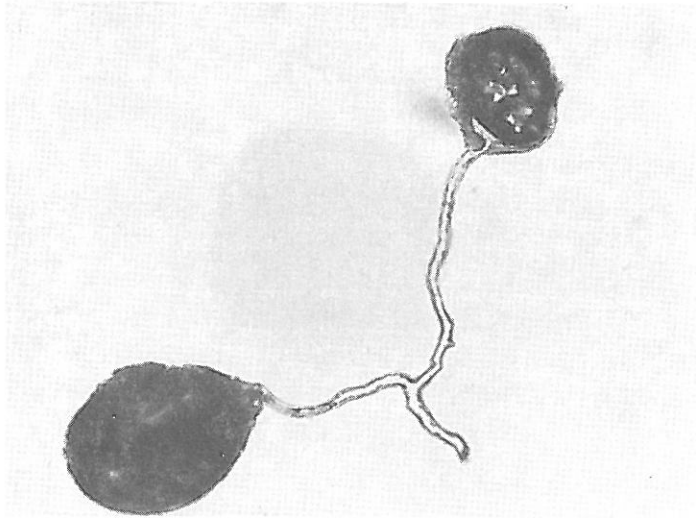
4. ábra

Egy tipikus vastagfalú, kerek, fekete színű Glomus klamidospóra

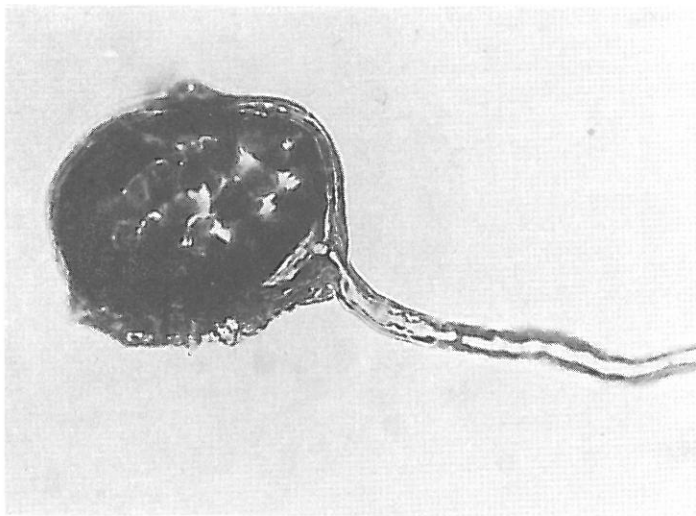


5. ábra

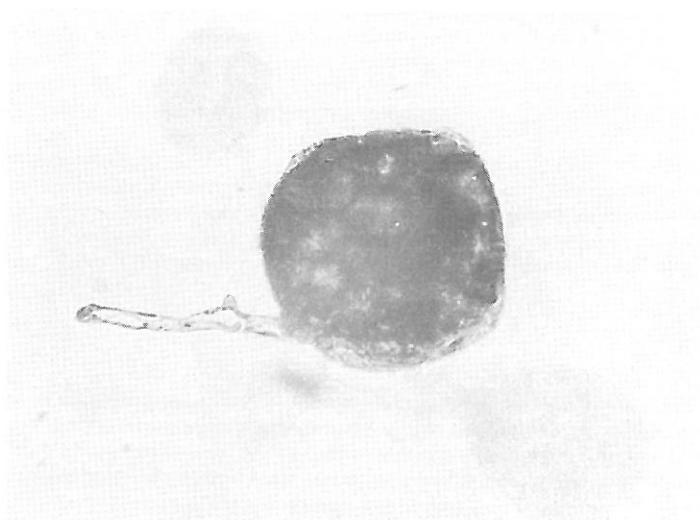
Kerek, világos barna színű Glomus klamidospóra hifacsatlakozással



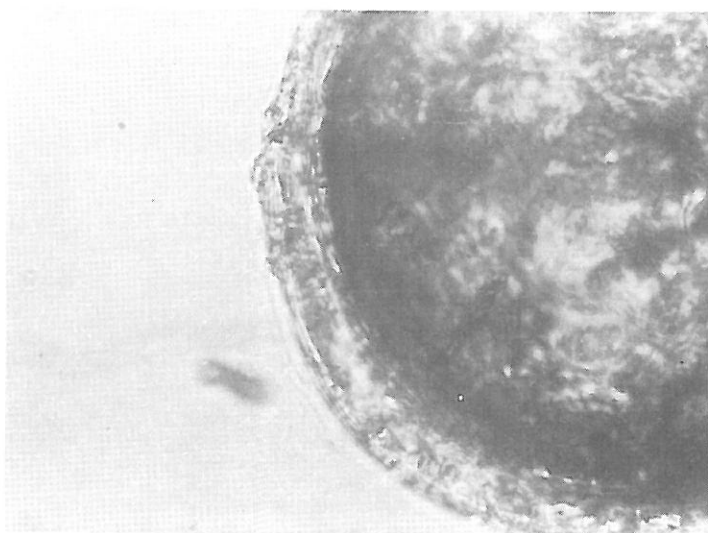
6. ábra
Elágazó hifavégein a Glomus nemzetségbe tartozó klamidospórákkal



7. ábra
Sötétbarna színű, nyomott tojás alakú Glomus klamidospóra



8. ábra
vékonyfalú, kocka alakú, barna színű Glomus klanidospóra



9. ábra
Glomus klanidospóra vastag falának a felépítése



10. ábra

Glomus klamidospóra vastag falának lemezes szerkezete

Glomus nemzetségbe tartozó spórák klamidospórák, amelyek sejtfala több rétegből áll /9. és 10. ábra/. A klamidospórák rétegeinek vizsgálata igen fontos a fajok elkülönítése szempontjából.

Összefoglalás

Magyarországon az endomikorrhiza gombák /Endogonaceae/, biológiájának kutatása - azon távoli cél érdekében, hogy segítségükkel kedvezőbbé tegyük egyes növények termesztését - napjainkig elhanyagolt területnek tekinthető. Ezeknek a gombáknak a vizsgálata elsősorban azért nehéz, mert mesterséges táptalajokon nem tenyészthetők, csak talajból izolált spóráik /azigospora, klamidospóra/ felszaporításával - gazdanövény jelenlétében - tudunk "tiszta vonalakat" izolálni. A tiszta vonalak fenntartása sem könnyű a fenti okok miatt. A vizsgálatukat akadályozó másik tényező az, hogy a különböző endomikorrhiza nemzetségbe tartozó izolátumok fajszerű morfológiai meghatározása igen nehéz.

Háromféle spóra izolálási módszert /talajlemez, nedves szitálás, cukorgrádiens centrifugálás/ próbáltunk ki. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a kukorica alóli talajminták spóratartalmának a meghatározására és a legtöbb spóratípus izolálására a nedves szitálás a legalkalmasabb módszer. A nedves szitálással izolált spóratípusok közül - morfológiai bélyegek alapján - az Acaulospora, a Gigaspora és a Glomus nemzetség képviselőit tudtuk azonosítani a vizsgálathoz használt kukorica monokultúra talajából.

Munkánk az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság felkérésére és támogatásával folyó endomikorrhiza kutatási program keretében készült.

Irodalom

- GERDEMANN, J. W. and NICOLSON, T. H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. mycol. Soc. 46. 235-244.
- HALL, I. R., 1984. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. In: VA Mycorrhiza. /Eds. POWELL, C. Li. and BAGYARAJ, D. J./, 57-95. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- HARLEY, F. R. S. and SMITH, S. E., 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London.
- JEFFRIES, P., 1987. Use of mycorrhizae in agriculture. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 5. 319-357.
- JENKINS, W. R., 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis. Rep. 48. 692.
- MILLNER, P. D., 1987. A spore collection apparatus for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia. 79. 899-900.
- OHMS, R. E., 1957. A flotation method for collecting spores of a phytomycetous mycorrhizal parasite from soil. Phytopathology. 46. 751-752.
- SCHENCK, N. C. /Ed./, 1982. Methods and principles of mycorrhizal research. Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, Minnesota.

Érkezett: 1988. május 23.

Isolation of Endomycorrhizal Fungi From Beneath Maize
Grown on Chernozem

Á. SZÉCSI, I. KÁDÁR and M. SZÁNTÓ

Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Research
Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian
Academy of Sciences, and Forestry Research Institute, Budapest

Summary

Endomycorrhizal fungi were isolated from chernozem soil samples with mycelia of lime, formed on loess, taken from a maize monoculture. In control plots left unfertilized for ten years, average samples /prepared from 20 point samples each/ were taken from the upper 0-25 cm ploughed layer in 3 replications. The soil samples were dried at 30-40 °C and then homogenized. The air-dry, homogenized samples served for the isolation of the spores of soil-borne endomycorrhizal fungi.

Three types of spore isolation methods, namely soil plate, wet sieving and decanting /GERDEMANN and NICOLSON, 1963/ and density gradient centrifugation /JENKINS, 1964; OHMS, 1957/ were tested. More spores were isolated using soil plates than with the other methods /Table 1/, but this method is extremely laborious and time-consuming, so it is only worth using when processing samples are expected to contain a large number of spores.

On the basis of the examinations it was found that wet sieving and decanting /GERDEMANN and NICOLSON, 1963/ was the most suitable for the determination of the spore content of soil samples taken from beneath maize and to isolate the largest number of spore types. Among the spore types isolated by wet sieving and decanting, representatives of the *Acaulospora* /Fig. 1/, *Gigaspora* /Figs. 2 and 3/ and *Glomus* /Figs. 4-10/ genera could be identified on the basis of spore morphological characteristics /HALL, 1984/. In the course of the morphological determination of a hundred randomly collected spores, the various genera had the numerical distribution illustrated in Table 2.

Work is now in progress on the determination of the spore types belonging to various genera on the basis of morphological features, i.e. on the identification of species.

Table 1. Number of endomycorrhizal fungus spores /40 µm/ in the soil of a maize monoculture using various isolation methods. /1/ Isolation method. a/ Soil plate; b/ Wet sieving and decanting; c/ Density gradient centrifugation. /2/ Spores per gram wet soil /averaged over 10 sub-samples/.

Table 2. Distribution of endomycorrhizal fungus spores according to genera in the soil of a maize monoculture. /1/ Spore type /genus/. /2/ From 100 spores.

Fig. 1. Azygospore of *Acaulospora* with hyphal attachment.

Fig. 2. Large, round azygospore of *Gigaspora* with bulbous suspensor and subtending hypha.

Fig. 3. Bulbous suspensor and subtending hypha characteristic of the *Gigaspora* genus.

Fig. 4. A typical thick-walled, round, black *Glomus* chlamydospore.

Fig. 5. Round, light brown *Glomus* chlamydospore with a hyphal attachment.

Fig. 6. Branching hypha with chlamydospore belonging to the *Glomus* genus.

- Fig. 7.* Dark brown, flattened egg-shaped Glomus chlamydospore.
Fig. 8. Thin-walled, cubic, brown Glomus chlamydospore.
Fig. 9. Construction of the thick wall of a Glomus chlamydospore.
Fig. 10. Wall layers of a Glomus chlamydospore.