



Mikorrhizálási kísérletek mikroszaporított fás növényekkel

Balla Ildikó

*Gyümölcs és Dísznövénytermesztési
Kutató Fejlesztő KHT, Érd - Budapest*

NAIK GYKI

Budapest, Park u. 2. H - 1223

e-mail: ildiko1balla@gmail.com

A növényvilág legnagyobb része, legalább 90 %-a természetes körülmények között különböző mikroorganizmusokkal, elsősorban mikorrhiza gombákkal és baktériumokkal él mindkét fél számára **hasznos** közösségben.

A 80-as években több kutatócsoport az akkori NSzK-ban, Franciaországban, Olaszországban kezdte vizsgálni ezeknek az együttéléseknek a hasznosságát a növényekre és a mikroorganizmusokra egyaránt. Régóta ismert, hogy a pillangósvirágúak gyökerén élő rhizóbiumok nitrogént kötnek meg a növény számára.

Körülbelül ezzel egy időben vált a mikroszaporítás egy széles körben elfogadott tömegszaporítási eljárássá.

- Az aszeptikus körülmények között előállított növények szinte kínálták magukat, mint együttélés vizsgálatára alkalmas objektumok.
- A mikroszaporítás, különösen a fás növények esetében, egyik legkritikusabb, időnként nagy veszteséggel járó fázisa az akklimatizálás. Felvetődött a kérdés, vajon a gyökerekkel szimbiózisban élő hasznos mikroorganizmusok mesterséges oltásával nem csökkenthetők-e ezek a veszteségek.

Ezen összetett kérdések megválaszolására azonban nem egy ember, egy kutatócsoport, hanem különböző intézmények kutató csoportjainak az összefogására volt szükség.

Ezt a munkát kezdeményezte és megalapozta a GyDKFV-ben **Vértesy Judit** a 80-as évek közepén, majd a 90-es évek közepétől 1998-tól **Balla Ildikó** folytatta és fejlesztette tovább.

Először csatlakozott a munkához az ektomikorrhiza gombák két szakértője: **Király István** és **Bratek Zoltán** - ő később már nem vett részt a munkában – az ELTE Növényélettani Tanszékéről, majd a későbbiekben még több fiatal is.

A GyDKFV-ben folyó munkákkal kapcsolatosan a laboratórium egyik fontos növényévé vált az ERTI munkatársai – **Keresztesi Béla**, **Bújtás Zoltán**, majd **Rédey Károly** - által nemesített akác, és vele együtt a rhizóbium.

A rhizóbiumok vizsgálatára, később izolálására az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézetében **Köves-Péchy Krisztina** vállalkozott. Majd szintén ugyanitt kezdődtek az endomikorrhizára vonatkozó kutatások **Vörös Ibolya**, **Takács Tünde** és **Bíró Borbála** által.

Idő közben a növények kikerültek a laboratóriumból és szükségessé vált az ültetvények talaját kitűnően ismerő szakember részvétele a munkában: **Szücs Endre** (GyDKFV) személyében. A munka is kilépett a laboratóriumi keretek közül a mikorrhiza gombák felhasználhatóságának vizsgálatával a talajuntság kiküszöbölésében.

Időközben a mikroorganizmusokkal végzett munka nem csak az egyes intézmények keretein lépett túl, hanem nemzetközi kereteket öltött: létrejött az elsősorban mikorrhiza kapcsolatokat vizsgáló **COST 870** program.

Lengyel – Magyar Kétoldalú Kormányközi Együttműködés keretében pedig a Skierniewice-i Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató Intézet Növényfiziológiai osztályának dolgozóival: **Bozenna Borkowskával** és **Barbara Michalczukkal** kerültünk munka kapcsolatba.

Természetesen minden Intézmény laboratóriumi dolgozói is kivették részüket a munkából.

A kezdetek

Tesztnövény: *Tilia cordata* 'Szeleste' – Józsa Miklós nemesítése.

Cél: mikroszaporítás

Mellékág: az ültetési közeg oltása ektomikorrhiza gombával.

Eredmény:

- az oltott közegben a túlélő növények növekedése erőteljesebb volt mint a kezeletlen közegben akklimatizáltaké.
- a növény és a gomba között tényleges kapcsolat nem volt kimutatható

Hipotézis: a gomba által kiválasztott anyagokat a növények hasznosították, ami kedvezően befolyásolta a tesztnövény fejlődését – nem került további vizsgálatra, bizonyításra.

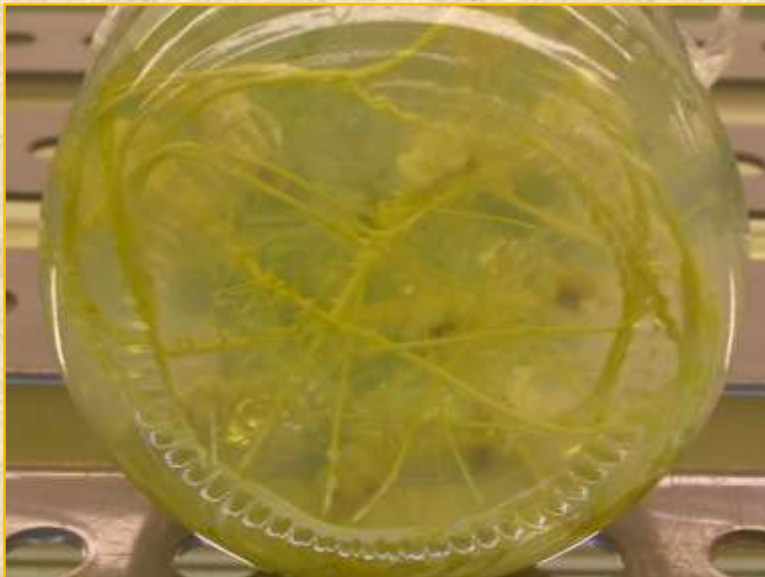
Az akác

Cél: az ERTI nemesített akácfajtáinak mikroszaporítása (kb.100).

Gond: az akklimatizálást túlélő növények alacsony száma és gyenge fejlődése.

Megfigyelés: a rhizóbiumok fogadására alkalmas képletek már *in vitro* állapotban kifejlődnek.

Következtetés: eredményes akklimatizáláshoz szükség van mesterséges rhizobium oltásra.



1. ábra
Gyökeres akác
növényké

Akác ültetvény talajából 15 steril rhizobium (Rb) vonal került izolálásra. Ebből a laboratóriumi körülmények között legjobban szaporodókkal oltottuk be az akklimatizálásra használt közeget. Két rhizobium vonal esetében endomikorrhiza (AM) gombát is adagoltunk a közegbe a rhizóbiiumok mellé, és megvizsgáltuk az endomikorrhiza gombák hatását rhizobiumok nélkül is.

2. - 3. ábra Akác klónok akklimatizálása az üvegházban



Eredmények

1. Táblázat - Mikroorganizmusokkal történt mesterséges oltás hatása mikroszaporított akác klón növekedésére (cm)

Kezelés	A növény kora		
	2,5 hónap	1,5 év	
	magasság	Össz hajtás	Magasság
Kontrol	42	146	58
Rb 2	62	73	85
Rb 3	38	300	99
Rb 3 + AMF	18	322	92
Rb 4	58	263	92
Rb 5	46	260	88
Rb 5 + AMF	18	80	40
Rb 6	44	343	108
Rb 11	56	162	71
AMF	18	-	-

Mikorrhizálási vizsgálatok csonthéjas alanyokon

Időközben irodalmi adatokból nyilvánvalóvá vált, hogy kedvező élettani hatás eléréséhez helyi izolátumok előállítására van szükség.

Ezeknek az izolátumoknak az előállítása az ELTE Növénytani tszén, ill a TAKI-ban történt.

Előzetesen megvizsgáltuk az akklimatizálásra használt közeg hatását mikroszaporított ,GF 677' és ,Fehér Besztercei' növények akklimatizálására

- Csernozjom barna erdőtalaj : zeolit - 3 : 1 arányú keveréke
- Pindstrup (Pindstrup Moseburg A/S DK 8550 Ryomgard, Danmark) tápdús közeg mikroszaporított növények akklimatizálására



4. ábra Az akklimatizálással egyidőben történő oltáshoz használt ,GF 677' növényké



5. ábra

Az AMF 110 gombatörzs hatása a 'Fehér Besztercei' alanyok túlélésére a csernozjom : zeolit – 3 : 1 közegben 4 hetes korban



6. ábra

Az AMF 110 gombatörzs hatása a 'Fehér Besztercei' alanyok túlélésére Pindstrup közegben 4 hetes korban



7. ábra

A 110 AMF gombatörzs kedvezőtlenül befolyásolta a 'GF 677' őszibarack alany növekedését a Pindstrup közegben



8. ábra

Az egyes AMF vonalak azonos közegben is eltérő hatásúak a különböző alanyokon

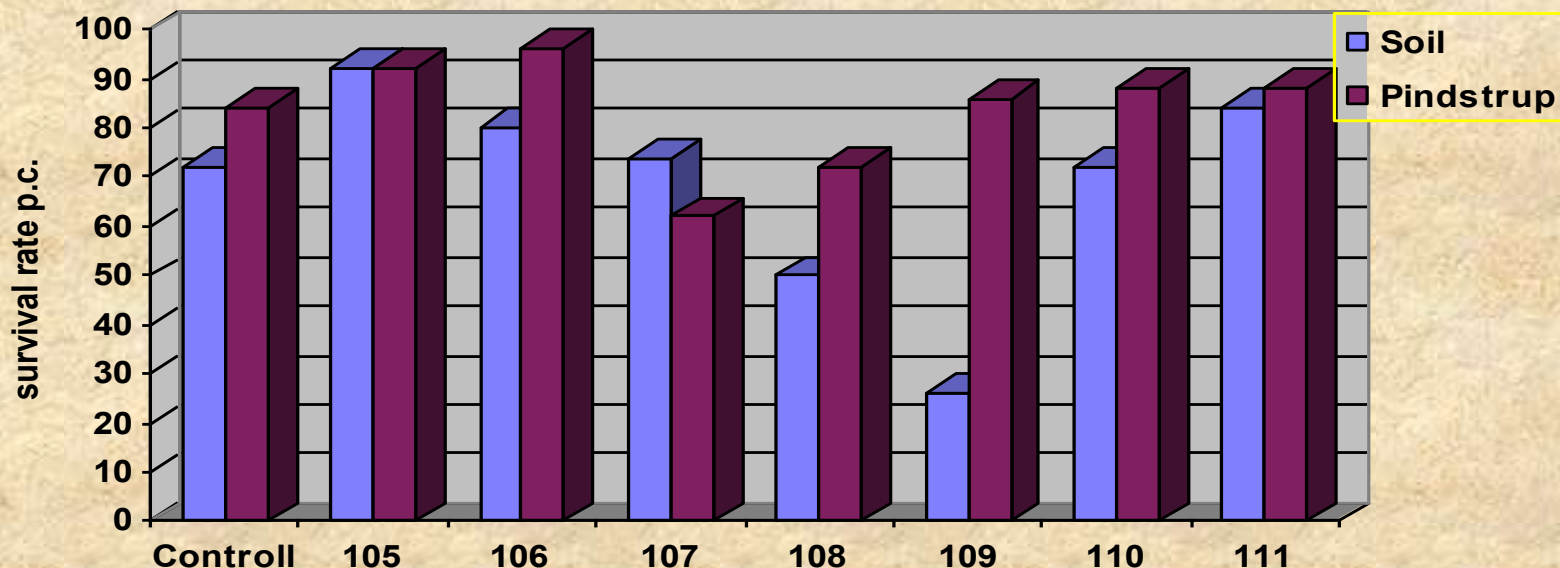
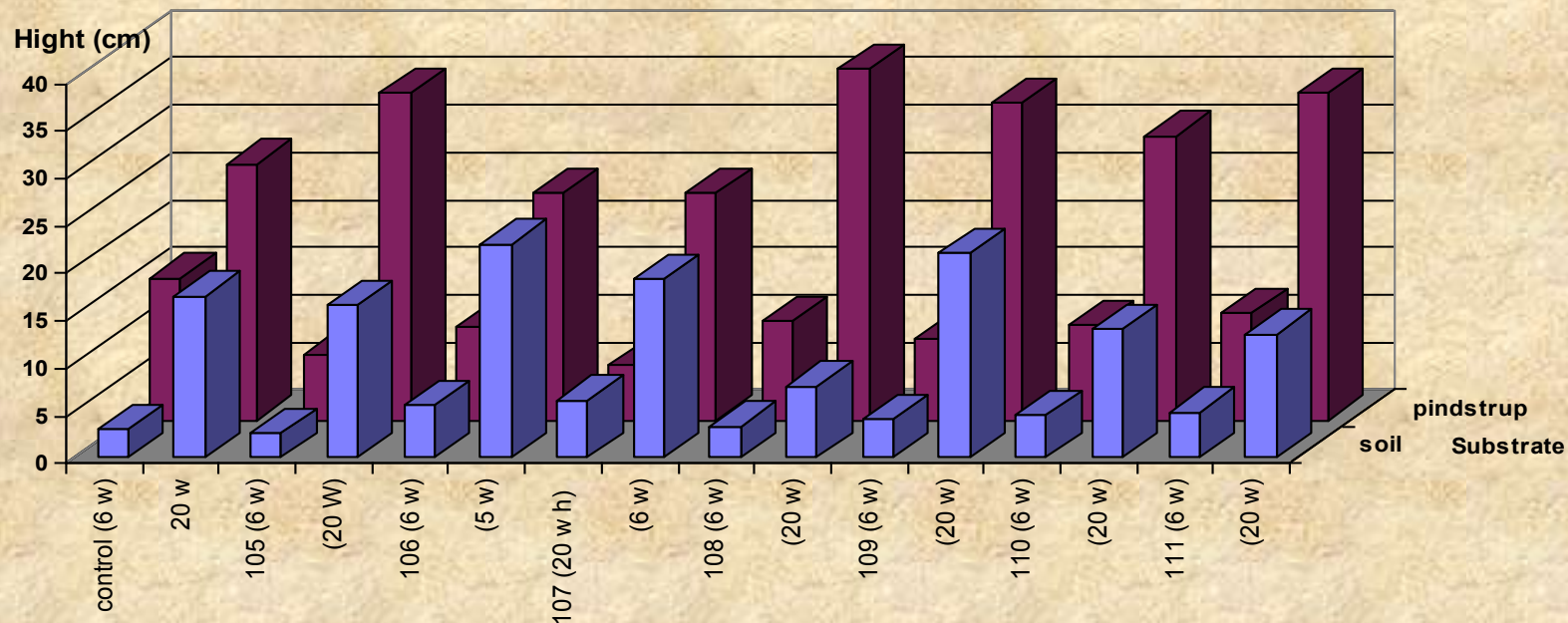


Fig. 2 - Survival rate of GF 677 peach rootstock, inoculated with AMF on two substrates (p.c.)

9. ábra **Különböző endomikorrhiza (AM) vonalakkal oltott ,GF 677' növények túlélése az akklimatizáció végén két szubsztrátban**

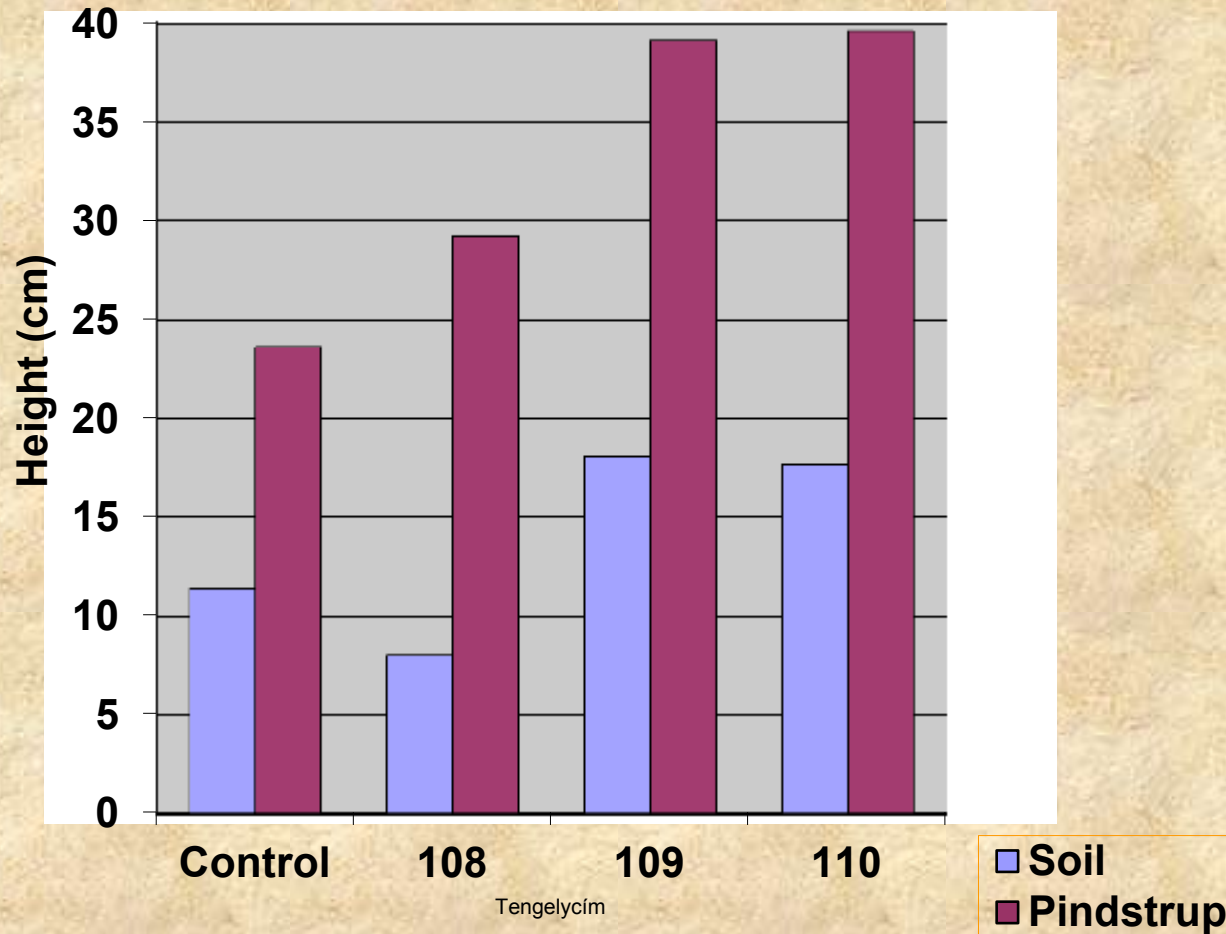
- A túlélést alapvetően az akklimatizálásra használt közeg minősége határozza meg.
- A mikorrhiza vonalak szelekciója szükséges.



10. ábra **Különböző AM vonalakkal oltott ,GF 677' növénykéek magassága 6 ill. 20 héttel az akklimatizáció után két szubsztrátban (cm)**

- A tápanyag szegény közegben, stressz helyzetben, a mikorrhiza hatás erőteljesebb.

11. ábra **A** ,Fehér Besztercei' szilva alany magassága két hónappal az AM oltás után két különböző szubsztrátban



**2. táblázat Különböző ektomikorrhiza törzsekkel oltott ,GF 677’
őszibarack alanyok magassága 6 ill. 24 héttel az oltás után**

EM gombatörzs jele	Növénymagasság (cm)	
	6. hét	24. hét
Kontrol	14,4	24,8
Piso 1	11,2	19,9
Piso 2	15,9	24,7
E 759	13,4	25,4
E 862	19,7	36,2
TB 1	14,0	19,7
TB 3	16,0	23,4

Piso – Pisolithus, E – Entoloma, TB – Entoloma Törökbálintról

A mikorrhizálás idejének meghatározása:

Tesztnövény: 'GF 677'

Mikorrhiza: 7 hazai izolálású AM gombatörzs

Közeg : Pindstrup keverék

Oltóanyag: a köztes gazdanövény (Tagetes, uborka, szudánifű, stb.) aprított gyökerének és a nevelési közegnek a keveréke

Inokulálás: 3 – 5 % oltóanyag a közeghez keverve

Inokulálás ideje:

- akklimatizációval együtt
- akklimatizációt követően

Mikorrhizálásra alkalmas ,GF 677' növénykéek akklimatizálás előtt
(12. ábra) és az akklimatizálást követően (13. ábra)

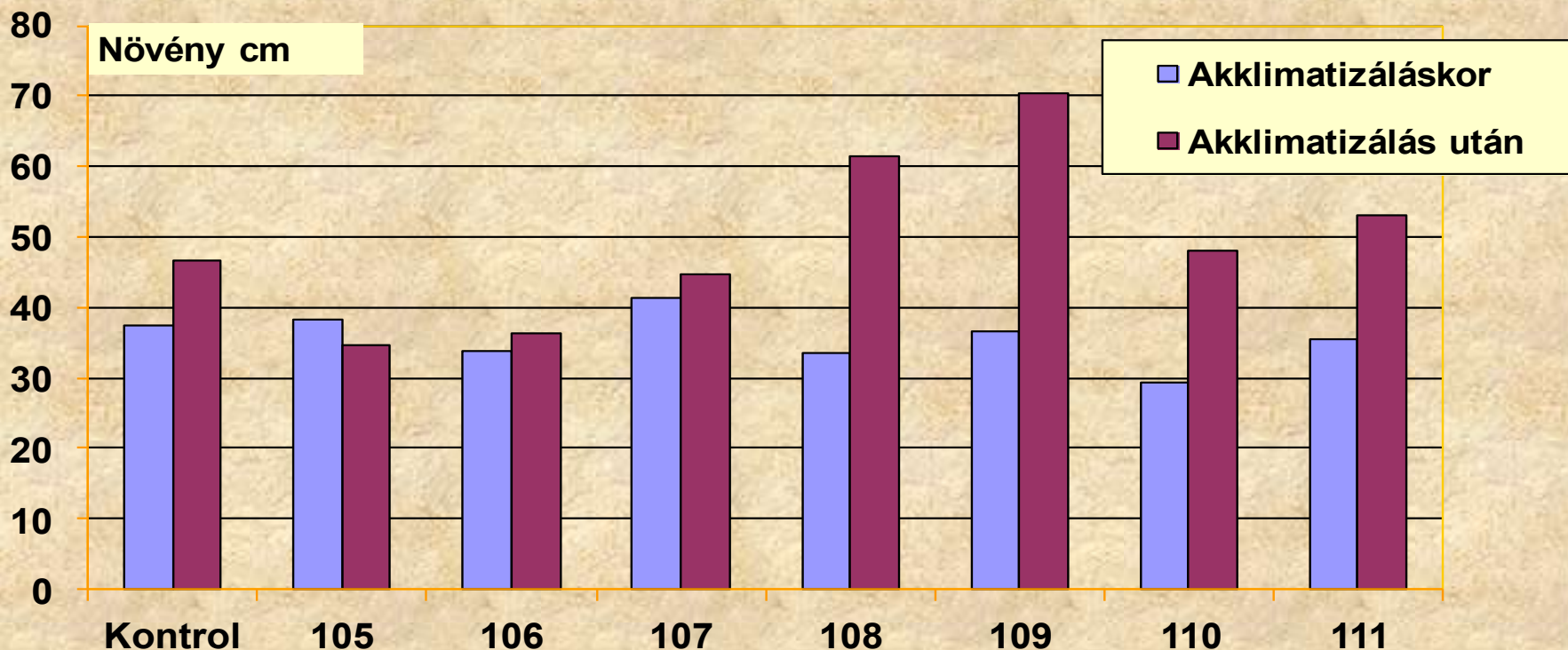
12. ábra



13. ábra



14. ábra **AM oltás hatása a 'GF 677' alanyok tenyészidő alatti növekedésére (cm)**



Az akklimatizált növények oltása kedvezően befolyásolja a tenyészidő alatti növekedést, de nagy gondot kell fordítani az AM gombatörzsek szelekciójára és infektivitásuk ellenőrzésére.

Következtetések

1. A mikorrhiza gombákkal történő oltás hatással van a mikroszaporított növények fejlődésére
2. A mikorrhiza vonalak hatása függ:
 - az oltott növény fajtól/fajtától
 - a használt szubsztrát minőségétől
 - az oltandó növény fiziológiai állapotától
 - az oltóanyag minőségétől
3. A mikorrhiza vonalak szelektálása szükséges
4. A mikorrhiza oltás, még szelektált vonalak esetében sem mindig pozitív hatású
5. A megfelelő mikorrhiza vonallal történő oltás serkentheti a mikroszaporított növények növekedési rátáját.
6. A steril származású mikroszaporított növények alkalmasak a mikorrhiza vonalak különböző célból történő tesztelésére, pl.: talajuntság kiküszöbölése.

Mikorrhiza gombák hatására létrejövő fiziológiai változások

A mikorrhiza gombák által okozott és leggyakrabban vizsgált hatások:

- stressztűrés - SOD aktivitás -,
szénhidrát akkumuláció - ,
MDA mennyiségének változása

Király István és csapata által végzett vizsgálatok.

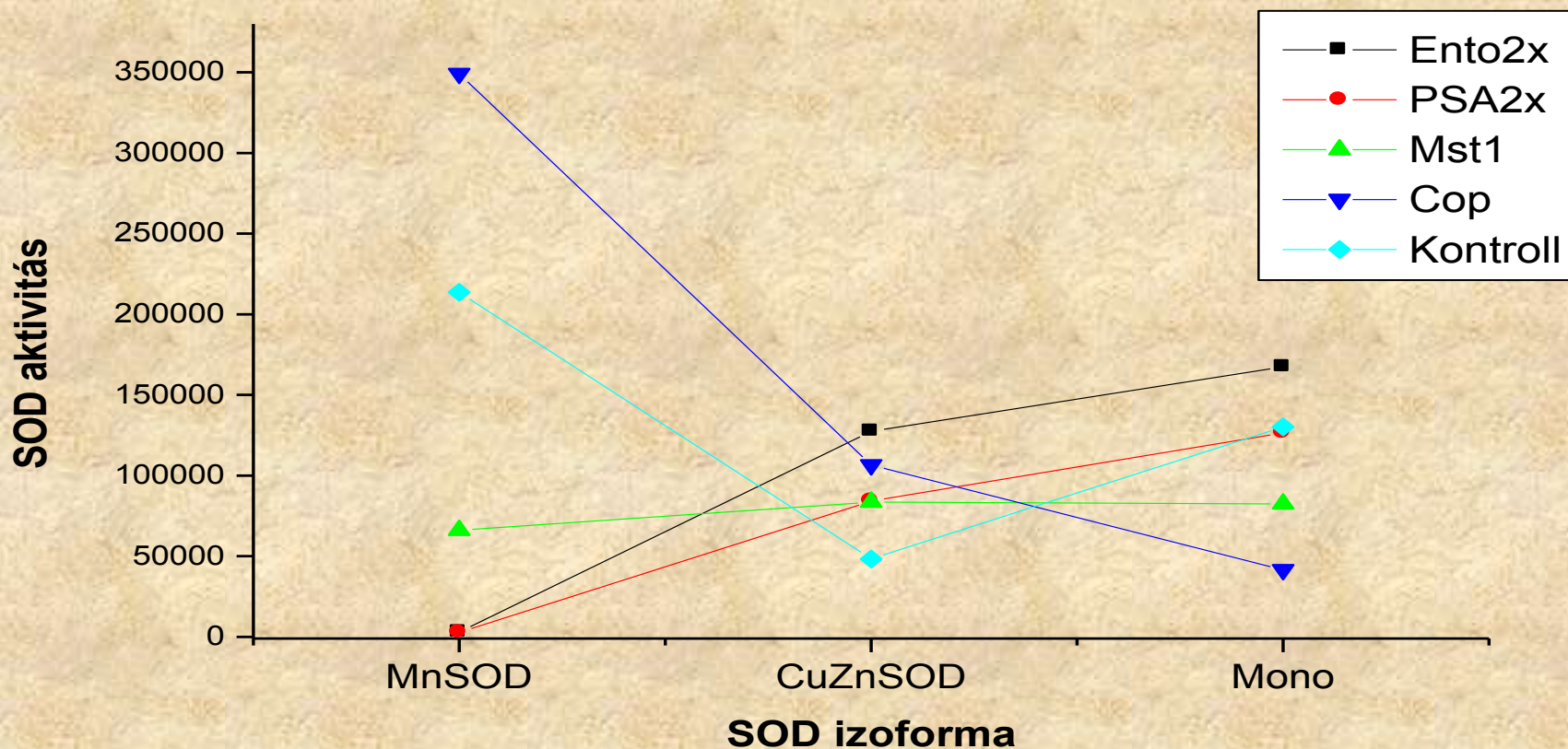
- biológiai aktivitás változása a fotoszintetikus aktivitás fokozása révén

Bozenna Borkowska által vezetett növényfiziológiai osztály munkája Skierniewiceben.

Stressz hatására az élő szervezetek elektron transzport rendszereiben keletkező káros oxigénformák (reactive oxigene species = ROS) mennyisége felszaporodik. Amennyiben ezt a mitokondriumokban működő védekező rendszer nem képes eliminálni az oxidatív stressz áterjed az egész sejtre, és a SOD (szuperoxid diszmutáz) izoformák aktivitása nő.

A mérési adatok kiértékelésénél legfontosabbnak tekintettük a kontrolhoz hasonló, vagy azt meghaladó MnSOD aktivitás változásait, mely a védekező rendszer aktivitásának növekedését jelenti, és mértük a réz-cink-SOD izoformák és a monolitok aktivitását is.

15. ábra **Az oxidatív stressz elleni védekezés (SOD aktivitás) változása kezelés hatására**



Az egyik leghatékonyabb a *Coprinus comatus* kezelés volt, de jó eredményeket mutatott *Entoloma clypeatum*mal és a *Morchella esculentával* végzett oltás is a stressz hatások leküzdésében.

A SOD aktivitás mérésénél kapott eredményeket erősítette meg a szénhidrát
akkumulációra vonatkozó mérés sorozat is: az *Entoloma clypeatum*, a *Coprinus*
comatus és a *Morchella* fajok (Mst: *M. steppicola*, Mesc: *M. esculenta*)
alkalmazása idézte elő a legjelentősebb vitalizációs hatást.

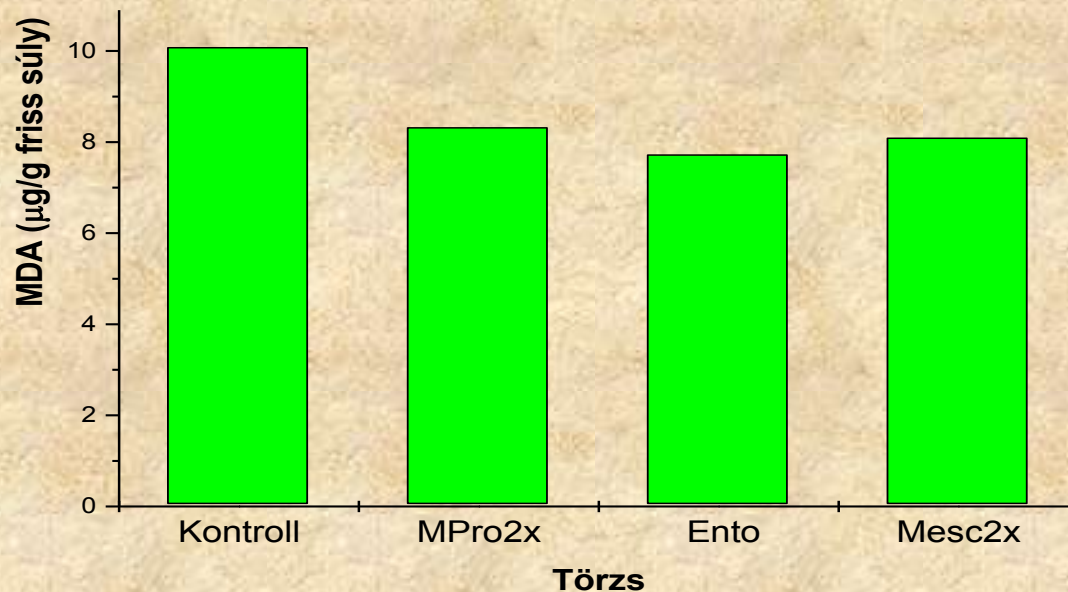
A glükóz és a szacharóz felhalmozódás a növény jó fiziológiai állapotát jelzi,
míg a fruktóz felhalmozódás stresszhelyzetben – pl.: szárazság – kerül
előtérbe.

16. ábra



A MDA (malondialdehyd) az oxidatív stressz során végbemenő lipidperoxidáció relatíve stabil terméke. Felhalmozódása a tartós stressz hatások eredménye, többnyire negatív korrelációt mutat a növény egészségi állapotával.

17. ábra **Ektomikorrhiza oltás hatása a növények MDA tartalmára**



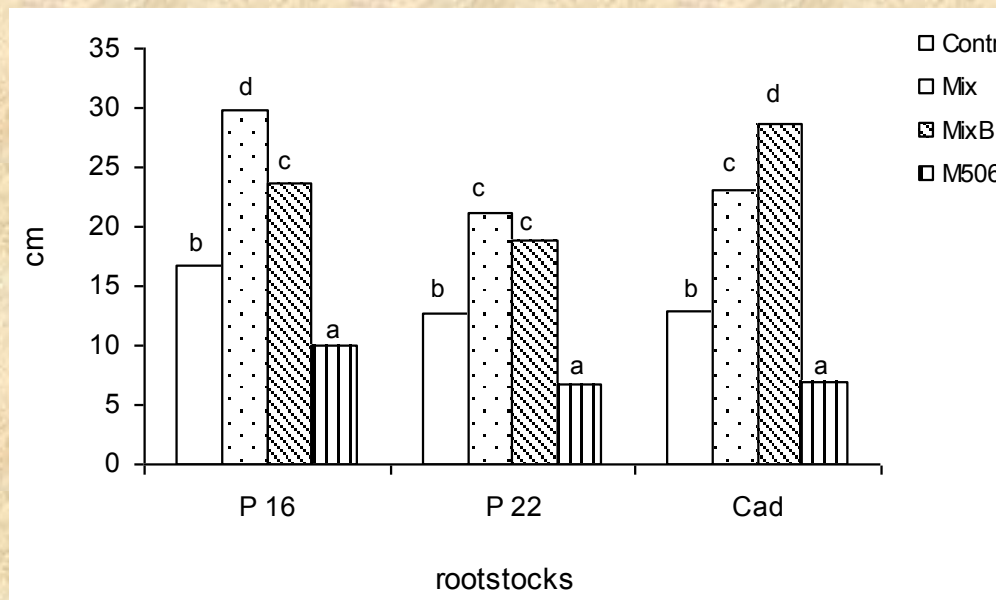
Mpro - *Macrolepiota procera* , Ento - *Entoloma clypeatum*, Mesp - *Morchella esculenta*

A lengyel együttműködés keretében folytatott kísérletekkel kiléptünk a csonthéjas körből: a 'Cadaman' mellett két lengyel nemesítésű, szabadalmaztatott törpe alma alanyt vizsgáltunk, a 'P16' és 'P22' jelűeket.

Az AM vonalak közül is csak az M 506 volt hazai izolálású vonal, és mellette még két kereskedelmi forgalomba kapható oltóanyagot teszteltünk: a Mix (Glomus ssp.) és a MixB (Mix + bacteria)-t Biorize, Franciaország.

Az akklimatizált csemetéket 2003 tavaszán oltottuk, és 2003 – 2004-ben mértük a magasságukat, levél felületüket, össz. klorofil és klorofil 'a' tartalmukat.

18. ábra **Mikorrhiza oltás hatása az alanyok növekedésére 2003-ban**





19.-20. ábra

A kereskedelembe kapható mikorrhiza keverék, a helper baktériumokkal dúsított mikorrhiza keverék, és a hazai izolálású mikorrhiza oltás hatása a 'P22' és a 'Cadaman' csemeték növekedésére az oltás évében



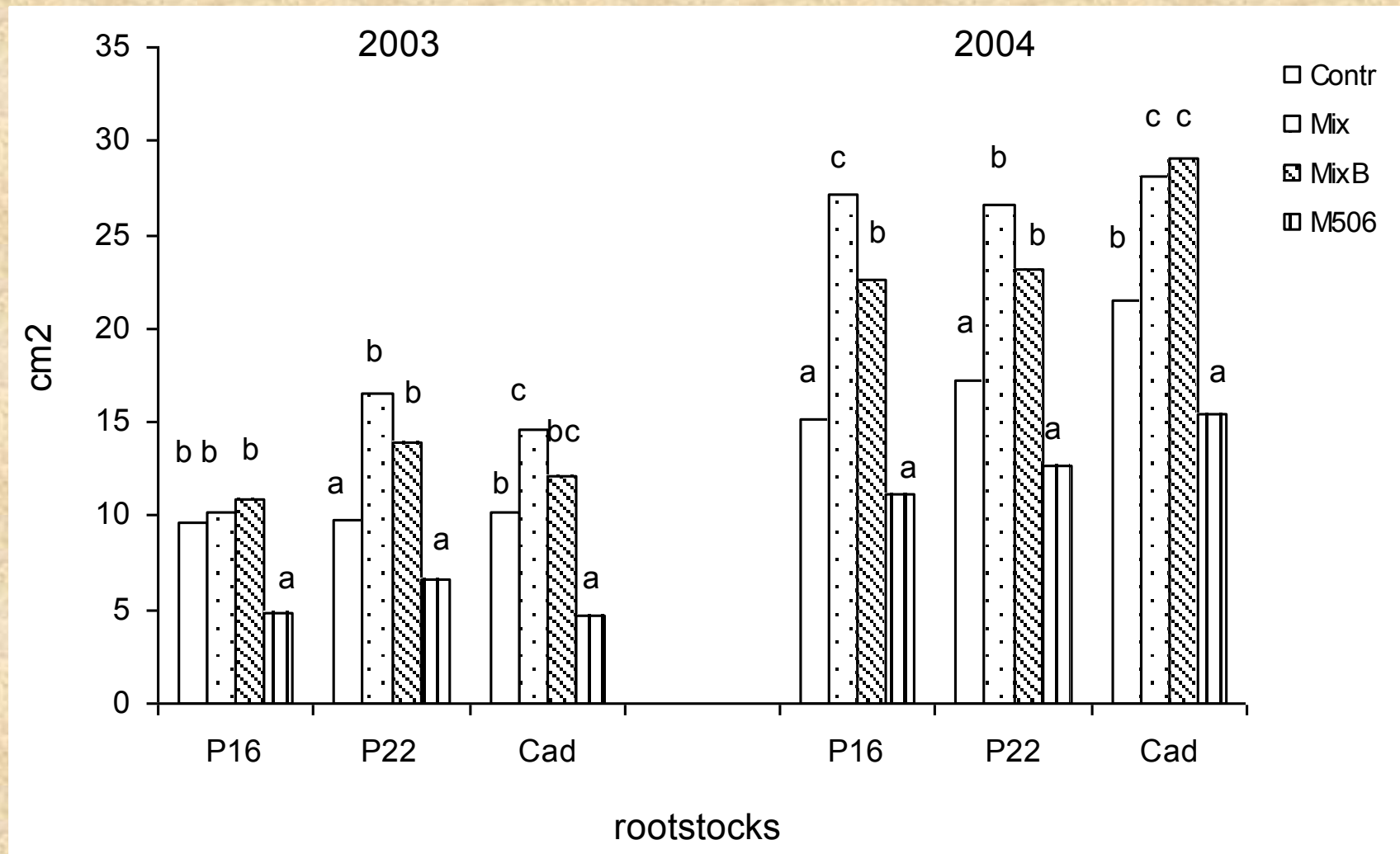
Contr

Mix

MixB

M506

21. ábra **Mikorrhiza oltás hatása a levélfelület nagyságára két egymást követő évben**



3. táblázat A levelek össz. klorofil tartalmának alakulása a kezelés hatására

Inoculum	2003			2004		
	P16	P22	Cadaman	P16	P22	Cadaman
Contr	39.69 b*	52.89 a	70.99 b	24.26 a	34.75 b	17.68 a
Mix	25.47 a	43.66 a	45.28 a	24.63 a	27.04 ab	18.31 a
MixB	24.31 a	41.68 a	42.19 a	31.89 b	24.87 a	14.73 a
M506	30,41 a	48.69 a	63.28 b	20.77 a	33.90 ab	15.34 a

4. táblázat Az őszibarack és alma alanyok maximális fotokémiai aktivitása a mikorrhiza oltás hatására

Inoculum	2003			2004		
	P16	P22	Cadaman	P16	P22	Cadaman
Contr	0.777 a	0.785 a	0.825 bc	0.782 a	0.794 a	0.835 a
Mix	0.764 a	0.781 a	0.827 c	0.782 a	0.793 a	0.839 a
MixB	0.765 a	0.787 a	0.816 ab	0.775 a	0.796 a	0.837 a
M506	0.760 a	0.770 a	0.814 a	0.771 a	0.781 a	0.835 a

A mikorrhiza oltás hatására a klorofil tartalom az első évben jelentősen csökkent, míg a második évben alig változott, és a fotokémiai aktivitásban sem volt mérhető szignifikáns különbség.

Ha figyelembe vesszük, hogy az össz. klorofil mérése egy 5 mm átmérőjű, tehát kb.: 20 mm² felületen történt, és a második évben a mikorrhizával oltott növények levélfelülete minden esetben szignifikánsan nagyobb, akkor arra következtethetünk, hogy a mikorrhizával oltott növények összes fotoszintetikus produktivitása is szignifikánsan nagyobb a kezeletlen kontrolokénál.

Tehát mindenképpen javasolhatjuk az alanyok szelektál mikorrhiza gombával történő kezelését a későbbi erőteljesebb fejlődés, a jobb stressztűrés és a jobb tápanyag feltárás érdekében.

22. – 23. ábra Mikorrhiza hatás tesztelése őszibarack alanyokon a talajuntság kiküszöbölése érdekében



A téma keretében született publikációk

1. Balla, I. - Péchyné, Köves, K. - . Vértesy, J. /1990/ Rhisobium Experiments in Micropropagation of *Robinia pseudoacacia* L. /poster VIIth Int. Congr. on Plant Tissue and Cell Culture Amsterdam
2. Bratek, Z., Király, I., Vértesy, J., Balla, I. /1994/ Effects of inoculation by ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated trees. 9th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Brno, Czech Republic, 3-8 Julius 1994. Biologia Plantarum /36/ 1994, p.: 328
3. Vértesy, J., Balla, I., Köves-Péchy, K., Vörös, I., Keresztesi, B., Bujtás, Z. /1995/ Szimbionta mikroorganizmusok alkalmazása mikroszaporított növényeknél.II. Növénynemesítési Tudományos Napok '94 /poszter/ 1995. január 16-17. Proc. p.: 85.
4. Balla, I., Vértesy, J., Vörös, I., Köves-Péchy, K. /1995/ Experiments on Mycorrhization of Peach and Black Locust Plants. Proc. COST 821. on Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-plant System 1995. p.: 212.
5. Vértesy, J., Balla, I., Köves- Péchy, K., Vörös, I., Keresztesy, B., Bujtás, Z. /1995/ Trials with Rhizobia and Mycorrhizae on Micropropagated Plants Proc. Conf. on Plant In Vitro Culture 1-3. Sept. 1995. Mosonmagyaróvár p.: 27.
6. Balla, I., Vértesy, J., Liber, M., Kucsma, N., Biró, B., Vörös, I. /1996/ Survival and growth of micropropagated peach and plum inoculated with endomycorrhizal strains Abstracts of 4th Int. Symp on Replant Problems, Budapest 1996 Aug. 12-16. p.: 13.

7. Balla, I., Vértesy, J., Köves-Péchy, K., Vörös, I., Bujtás, Z. /1996/ Acclimation Results of Micropropagated Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) Improved by Symbiotic Microorganisms. Abstracts of II. Int. Symp. on Bacterial and Bacteria-like Contaminants of Plant Tissue Cultures, Cork, Ireland 3-6 Sept. 1996. p.: 29.
8. Kucsma, N., Bíró, B., Vörös, I., Balla, I., Vértesy, J., Lieber, M. (1996) Various Endomycorrhizal Strains and Growing Substrates Affected the Acclimation of Micropropagated Peach and Plum. Abstracts of Cost Action 8.21 on Arbuscular Mycorrhizae in Sustainable Soil-plant System Budapest, 19-21. Sept. 1996. p.: 19.
9. Balla, I., Vértesy, J., Köves-Péchy K., Vörös, I., Bujtás, Z. and Bíró, B. /1997/ Acclimation results of micropropagated Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by symbiotic microorganisms. in Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation Ed. A.C.Cassels Published by Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, p.: 351-354.
10. Balla, I., Vértesy, J., Bíró, B., Vörös, I. /1998/ Survival and Growth of Micropropagated Peach Inoculated with Endomycorrhizal Strains. Acta Horticulturae 477 p.: 115-123
11. Balla, I., Vértesy, J., Köves-Péchy, K., Vörös, I., Bujtás, Z. and Bíró, B. /1998/ Acclimation results of micropropagated Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) improved by symbiotic micro-organisms. Plant Cell Tissue and Organ Culture 52. p.: 113-115.
12. Balla, I., Vértesy, J., Bíró, B., Vörös, I. /1998./ Examinations of timing of AMF inoculation on micropropagated peach rootstock GF 677. poszter „Létfontosságú rizoszfére létesítés” című konferencián, Edinburgh 1998. szept.17-19. abstract p.: 21.

13. Balla, I., Vértessy, J., Bíró, B., Vörös, I. /1998/ Arbuszkuláris mikorrhiza gombával végzett oltás hatásának vizsgálata mikroszaporított GF 677 őszibarack alanyokra. Abstract a Lippai János - Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak Gyümölcstermesztési Szekciójáról p.: 160-161.
14. Király, I., Balla, I., Jakab, J. /1998/ Responses of the photosynthetic system and the peroxidase activity to the rooting conditions during oak micropropagation. Abstract of the 5th Meeting of the COST 822 Working Group 3 on "Identification and control of phase changes in rejuvenation" p.: 18-21.
15. Balla, I., Vértessy, J., Bíró, B., Vörös, I. /1998/ Micropropagation of apricot rootstock "Fehér Besztercei" and AMF inoculation trials. Abstract of Symposium zum Gedenken an die 100. Wiederkehr der Begründung der Gewebekultur durch Gottlieb Haberlandt. 8 - 9. October 1998. Wien p.: 21.
16. Balla, I., Szücs, E., Vörös, I., Bíró, B. /2000/ Growth improvement of the micropropagated GF 677 by the use of endomycorrhizal inoculation. Abstracts of the First meeting of COST 843 WG 3 on Quality Enhancement of Plant Production through Tissue Culture. November 23 – 25, 2000. Blankenberge, Belgium. p.: 12 – 14.
17. I. Király, I. Balla, J. Jakab, L. Tamás and É. Sárvári /2001/: Responses of the photosynthetic system and peroxidase activity to the rooting conditions of oak micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 66, p.: 155-158
18. Jakab, J., Király, I., Bóka, K. and Balla, I. (2002): Glucanase and chitinase activity in plant-fungi interactions. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 49 (2-3) 398
19. Balla, I., Szücs, E., Vörös, I. and Bíró, B. /2004/ Mycorrhization for improving the acclimatization period of micropropagated stone-fruit rootstocks. COST 838 21-23. Oct. 2004 Granada, Spain – poster, Book of Abstracts p.: 91

20. I Balla, E Szücs, B Borkowska, B Michalczuk: Evaluation the response of micropropagated peach and apple rootstocks to different mycorrhizal inocula. F. FELDMANN, Y. KAPULNIK, J. BAAR (EDS.) Mycorrhiza Works. Proceedings of the International Symposium „Mycorrhiza for Plant Vitality“ and the Joint Meeting of Working Groups 1-4 of COST Action 870, 03-05 October 2007, Hannover, Germany. p.:8-16.
21. I Balla, Z Kirilla, E Szücs, I Vörös, T Takács, B Biró and B Borkowska : Artificial AMF inoculation of micropropagated rootstocks. in F. FELDMANN, Y. KAPULNIK, J. BAAR (EDS.) Mycorrhiza Works Proceedings of the International Symposium „Mycorrhiza for Plant Vitality“ and the Joint Meeting of Working Groups 1-4 of COST Action 870, 03-05 October 2007, Hannover, Germany. p.:17-26.
22. E Szücs, I Balla, Z Kirilla, I Vörös, T Takács, I Király, P Czövek: Symbiotic and vitalizing effects of microorganisms in counterbalancing the replant disease of fruit trees. F. FELDMANN, Y. KAPULNIK, J. BAAR (EDS.) Mycorrhiza Works. Proceedings of the International Symposium „Mycorrhiza for Plant Vitality“ an the Joint Meeting of Working Groups 1-4 of COST Action 870, 03-05 October 2007, Hannover, Germany. p.:93 – 102.
23. B. Borkowska, I. Balla, E.Szücs and B. Mihalczuk. 2008. Evaluation of the response of micropropagated peach rootstock 'Cadaman' and cv. 'Chresthaven' to micorrhization using chlorophyll A fluorescence method. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 16, 2008: 243 – 260.