**Предварительная колонизация арбускулярными микоризными грибами для улучшения роста и здоровья клубники (*Fragaria* x *ananassa*)**

**Benjamin LANGENDORF**

**Доктор философии**

**Йоркский университет**

**Биология**

**Август 2017 года**

**Глава 1**

**Абстрактный**

Предварительная колонизация растений арбускулярными микоризными грибами (AMF) перед пересевом была предложена в качестве метода защиты сельскохозяйственных культур от биотических и абиотических стрессов и / или повышения продуктивности растений Системы выращивания клубники (*Fragaria* x *ananassa*) делают предварительную инокуляцию AMF на стадии отъема от груди относительно простой для *проростков in vitro* и побегов Клубничные пробки предварительно инокулировали различными видами AMF, чтобы изучить (1), может ли AMF предварительно колонизировать различные сорта клубники в условиях высокой влажности и субстрата без почвы во время процесса отъема, (2) может ли AMF выдержать требуемое искусственное замораживание клубничных пробок в течение нескольких месяцев и (3) может ли AMF повысить устойчивость растений к *Verticillium dahliae*, *Phytophthora fragariae* и *P cactorum* Кроме того, (4) AMF инокулировали при посадке, чтобы изучить, может ли AMF увеличить рост и урожайность клубники при выращивании в кокосовой койре, и (5) простая *in vitro* автотрофная система in vitro также была разработана для изучения взаимодействия AMF-патоген клубники в аксенных и контролируемых условиях Исследование показало, что испытанные субстраты без почвы и условия высокой влажности во время опрокидывания не помешали различным AMF колонизировать корни клубничных пробок Пре

инокулированные виды AMF также могут выдерживать хранение в холодильнике при температуре -2 ° C с клубничными пробками в течение нескольких месяцев Однако предварительная колонизация AMF и / или инокуляция AMF при посадке не повышали устойчивость растений к корневым патогенам Было продемонстрировано, что инокуляция AMF в кокосовую койру существенно не увеличивала рост и урожайность растений Наконец, микроразмноженная клубника была успешно заражена *P fragariae in vitro* с соответствующими симптомами заболевания, в то время *как V dahlia* и AMF могли прорастать, но не колонизировали корни клубники в системе автотрофной культуры Насколько нам известно, это первое исследование, посвященное взаимодействию AMF и клубники в качестве модельной системы для изучения возможности предварительной колонизации клубничных пробковых материалов для повышения продуктивности растений и устойчивости к основным болезням корней клубники

~ 2 ~

**Глава 1**

 **Содержание**

**Абстрактный 2**

**Оглавление 3**

**Список таблиц 8**

**Список цифр 10**

**Благодарностей 19**

**Заявление авторов 20**

**Глава 1 Общее введение 21**

1 1 *Fragaria* x *ananassa* в коммерческом садоводстве …21

1 2 Болезни клубники и борьба с ними 23

1 3 Роль грибов арбускулярной микоризы 25

1 4 Взаимодействие между клубникой и AMF 26

1 5 Борьба с болезнями корней растений автор AMF 28

1 6 Факторы, ограничивающие внедрение AMF при коммерческом производстве клубники 29

1 7 Цели проекта 32

**Глава 2 Общие методы 36**

2 1 Грибы арбускулярной микоризы инокулята 36

2 1 1 Источник инфекции и вакцинации 36

2 1 2 Наиболее вероятного числа биопроб 37

2 2 Завод materials 38

 2 2 1 Производство вегетативно размноженных растений земляники 38 2 2 2 Производство бегуна-советы 39 2 2 3 Рост средний и клубника саженцы отъема 39 2 3 Грибы арбускулярной микоризы количественная оценка 43 2 3 1 Корень отбора проб и окрашивание 43 2 3 2 Длина корня колонизации оценка 44

~ 3 ~

**Глава 1**

**Глава 3 Практика отъема клубники от розетки и замораживание в холодильнике не предотвращают колонизацию корней арбускулярными микоризными грибами, возникающими в результате ранней инокуляции 45**

3 1 Введение 45 3 2 Материалы и методы 48 3 2 1 Инокуляция арбускулярных грибов микоризы 52 3 2 2 Источник растительного сырья, отъема и размножения 53 3 2 3 Повторный рост клубничных пробок после замораживания при хранении в холодильнике 57 3 2 4 Анализ образцов корней и рост растений 58 3 2 5 Анализ данных 59 3 3 Результаты 60 3 3 1 Влияние условий отлучения от груди на колонизацию АМФ 60 3 3 2 Влияние AMF на рост пересадки клубничной пробки 67 3 3 3 Влияние холодного хранения на выживаемость AMF и DSE 72 3 3 4 Уровень колонизации корней AMF в зависимости от DSE и холодного хранения 74 3 4 Обсуждение 75 3 4 1 Влияние условий отлучения от груди на колонизацию AMF 75 3 4 2 Влияние сорта клубники и размера растения на уровень колонизации корней 79 3 4 3 Влияние предварительной инокуляции AMF на рост клубничной пробки 80 3 4 4 Влияние холодного хранения на наличие АМФ после повторного роста пробки 81 3 4 5 Влияние DSE и холодного хранения на уровень колонизации корней AMF 82 3 5 Выводы и перспективы 84

**Глава 4 Оценка потенциала предварительно колонизированных клубничных пробок с микоризными инокулянтами для повышения устойчивости к *вертициллиозному* увяданию 87**

4 1 Введение 87 4 2 Материалы и методы 88 4 2 1 Растительные материалы 91 4 2 2 Определение плотности инокулята увядания в полевых почвах 91

~ 4 ~

**Глава 1**

4 2 3 Пересадка штекера в загрязненные вялостью почвы 91 4 2 4 Анализ образцов корней и рост растений 93 4 2 5 Оценка заболевания 95 4 2 6 Анализ данных 95

4 3 Результаты 96 4 3 1 Создание инокулянтов AMF после трансплантации пробки 96 4 3 2 Влияние предварительной инокуляции AMF на рост растений 98 4 3 3 Влияние предварительной инокуляции AMF на заболеваемость клубникой 100 4 4 Обсуждение 104

**Глава 5 Оценка потенциала грибов арбускулярной микоризы и ризобактерий, стимулирующих рост растений, для повышения урожайности земляники и устойчивости к *Phytophthora fragariae* и *Phytophthora cactor* в беспочвенных субстратах 109**

5 1 Введение 109 5 2 Материалы и методы 111 5 2 1 Растительный материал 113 5 2 2 Полезные прививки от микробов 115 5 2 3 Инокуляция патогенов 116 5 2 4 Трансплантация 117 5 2 5 Оценка заболеваний, продуктивности растений и анализ образцов корней 120 5 2 6 Анализ данных 121 5 3 Результаты 122 5 3 1 Образование АМФ в субстратах 122 5 3 2 Действие полезных микробов против красной сердцевины и корончатой гнили 122 5 3 3 Влияние AMF и PGPR на производство клубники в кокосовой койре 125 5 4 Обсуждение 127 5 5 Заключение 130

~ 5 ~

**Глава 1**

**Глава 6 Можно ли создать аксеновую автотрофную *in vitro* систему in vitro для изучения природы взаимодействий между AMF и почвенными патогенами на растениях земляники? 131**

6 1 Введение 131 6 2 Материалы и методы 132 6 2 1 Растительные материалы 134 6 2 2 Арбускулярный грибок микоризы 134 6 2 3 Формирование всходов земляники в аксенных условиях 134 6 2 4 Инокуляция саженцев клубники препаратом AMF 135 6 2 5 Патогенные микроорганизмы, переносимые почвой 135 6 2 6 Инокуляция саженцев земляники патогенными микроорганизмами 136

6 2 7 Оценка тяжести заболевания и оценка колонизации корней АМФ и патогенами 137

6 2 8 Анализ данных 138 6 3 Результаты 138 6 4 Обсуждение 143 6 5 Выводы 145

**Глава 7 Общее обсуждение 146**

7 1 Обзор 146

7 1 1 Методы отъема клубничных вилочек и замораживание в холодильнике не предотвращают колонизацию корней AMF, возникающую в результате ранней инокуляции 148

7 1 2 Оценка потенциала предварительно колонизированных клубничных пробок с микоризными инокулянтами для повышения устойчивости к *вертициллезному* увяданию 150

7 1 3 Влияние AMF и PGPR на урожайность клубники и устойчивость к *Phytophthora* болезням фитофторой в беспочвенных субстратах 152

7 1 4 Использование аксеновой автотрофной *in vitro* системы in vitro для изучения природы взаимодействий между AMF и почвенными патогенами 153

7 2 Рекомендации и будущая работа 154

~ 6 ~

**Глава 1**

**Список сокращений 161 Список литературы 166**

~ 7 ~

**Глава 1**

**Список таблиц**

**Таблица 2 1:** Виды арбускулярных микоризных грибов (AMF), использованные в исследованиях (любезно предоставлено Plantworks Ltd, Кент, Великобритания) 36

**Таблица 3 1:** Подробная информация о пяти экспериментах по изучению арбускулярных микоризных грибов (AMF) перед инокуляцией клубничной пробки на стадии отъема (эксперимент 1-4) и влияния холодного хранения при -2 ° C на выживание AMF в колонизированных корнях клубники (эксперимент 5) 51

**Таблица 3 2:** Количество инфекционных ростков грибов арбускулярной микоризы (AMF) на мл инокулята-субстрата-носителя, используемого для инокуляции растений земляники в экспериментах 1-5 52

**Таблица 3 3:** Средний диаметр коронки клубничного побега для эксплантов ‘большого’ и ‘маленького’ размера в эксперименте 4 54

**Таблица 3 4:** Фоновый анализ состояния питательныхвеществ a питательной среды, используемой в экспериментах 54

**Таблица 3 5:** Результаты трехстороннего ANOVA общего процента колонизации корней грибами арбускулярной микоризы (AMF, % RLC) в клубничных пробках, выращенных в течение 7 недель в ирландской смеси темный торф / перлит (7: 3, v / v) в условиях теплицы (эксперимент 4) Существенные различия выделены жирным шрифтом (P ≤ 0 05) 66

**Таблица 3 6:** Процент заселения длины корня грибами арбускулярной микоризы (AMF, % RLC) и темно-септичными эндофитами (DSE, % DSE) *Fragaria* x *ananassa* plug cv ‘Vibrant’ и ‘Red Glory’, инокулированными отдельными видами AMF (*воронкообразные мхи*, *Rhizophagus irregularis*или *Claroideoglomus claroideum*) после 113 дней культивирования в смеси ирландский темный торф / перлит (7: 3, в /в) в условиях теплицы / политоннеля (эксперимент 5) 67

**Таблица 3 7:** Результаты трехстороннего анализа ANOVA диаметра кроны растений (мм) и обобщенной линейной модели (GLM) выживаемости (%) растений, предварительно инокулированных арбускулярными микоризными грибами (AMF) и выращенных в течение 7 недель в ирландской смеси темный торф / перлит (7:3, v /v) в условиях теплицы (эксперимент 4) Существенные различия выделены жирным шрифтом (*P* ≤ 0 05) 71

~ 8 ~

**Глава 1**

**Таблица 3 8:** Результаты трехфакторного ANOVA для определения процентного содержания грибов арбускулярной микоризы (AMF, % RLC) в уровнях колонизации корней клубники, предварительно инокулированных AMF, хранящихся в холоде при -2 ° C в течение одного-пяти месяцев и повторно выращиваемых в течение 30 дней в помещении для выращивания при 22 °C Существенные различия выделены жирным шрифтом (*P* ≤ 0 05) 75

**Таблица 3 9:** Краткое изложение результатов пяти экспериментов, представленных в главе 3 Далее представлены только основные факторы, а взаимодействия между факторами опущены для ясности 86

**Таблица 4 1:** Краткое изложение трех экспериментов по изучению влияния ранней колонизации арбускулярными микоризными грибами (AMF) саженцев клубники на развитие увядания, вызванного *Verticillium dahliae* 90

**Таблица 4 2:** Анализ фонового состояния питательныхвеществ a полевой почвы (серия барминга), использованной в трех экспериментах 93

**Таблица 4 3:** Количество увядших и здоровых растений в эксперименте 2 для обработки без или с предварительной инокуляцией AMF сортов клубники ‘Vibrant’ и ‘Red Glory’ 102

**Таблица 5 1:** Краткое изложение четырех экспериментов по изучению влияния арбускулярных микоризных грибов (AMF) и стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR) на здоровье или продуктивность растений земляники на беспочвенных субстратах в контролируемых условиях 112

**Таблица 5 2:** Фоновый анализ питательного статусаa субстрата, используемого в экспериментах 120

~ 9 ~

**Глава 1**

**Список цифр**

**Рисунок 1 1:** Обзор рассмотренных систем выращивания клубники и шести гипотез Гипотезы изложены не полностью для ясности (раздел 1 7) 35

**Рисунок 2 1:** *Zea mays* используется в качестве растений-ловушек, выращиваемых в тепличных условиях, для оценки концентрации инокулята AMF При каждом разведении инокулята AMF использовали пять повторных горшков: 1/10, 1/100 и 1/1000 38

**Рисунок 2 2:** Микропланты, отнятые от груди внутри размножителей растений, которые содержались в условиях комнатного выращивания 40

**Рисунок 2 3:** (А) Направляющие, готовые к закреплению на смеси ирландского темного торфа и перлита (7:3, v /v) (B) Пересадка клубничной пробки внутри шкафа системы запотевания (C) Заглушки, выращиваемые в тепличных условиях через 7 недель после пересадки 42

**Рисунок 2 4:** Способ крепления окрашенного корня на предметных стеклах (рисунок адаптирован из www2 dijon inra fr/mychintec/Protocole/Image3 pdf) 43

**Рисунок 2 5:** Микроскопический метод оценки колонизации длины корня клубники (% RLC) грибами арбускулярной микоризы Случайно выбранное поле зрения микроскопа и положение перекрестия показывают различные возможные пересечения 44

**Рисунок 3 1:** Схематическое представление экспериментальной установки для изучения эффекта предварительной инокуляции саженцев клубники арбускулярными микоризными грибами (AMF) во время отъема и размножения Были получены микропланшеты и побеги (Этап 1), закреплены в смеси вермикулит, кокосовая койра или ирландский темный торф / перлит (7: 3, v / v), а затем отлучены от груди примерно на 2 недели в размножителе или туманоуловителе (Этап 2) Новообразованные корни оценивали на степень колонизации AMF в конце размножения штекерного трансплантата (этап 3) 49

**Рисунок 3 2:** Схематическое представление экспериментальной установки для изучения влияния холодного хранения на выживаемость арбускулярных микоризных грибов (AMF) в колонизированных корнях земляники Холодильное хранение

~ 10 ~

**Глава 1**

при -2°C AMF предварительно инокулируют клубничные пробковые трансплантаты (Этап 1) Растения повторно помещали в горшки с ежемесячными интервалами (от 1 до 5 месяцев) в автоклавированную аттапульгитовую глину и помещали в помещение для выращивания при температуре 22°C (Этап 2) Новообразованные корни оценивали на степень колонизации AMF через месяц после трансплантации (этап 3) 50

**Рисунок 3 3:** (А) Микропланты (эксперимент 1), выращенные на автоклавированном вермикулите внутри размножителей растений, хранящихся в условиях комнатного выращивания при температуре 22 °C (B) Клубничные пробки через 6 недель после трансплантации 55

**Рисунок 3 4:** (А) Клубничные пробки в конце эксперимента 2 (через 8 недель после трансплантации) (Б) Клубничная пробка, выращенная на неавтоклавированном вермикулите (C) Клубничная пробка, выращенная на неавтоклавированной кокосовой койре, с видимым слоем порошка инокулята AMF (см красную стрелку) 55

**Рисунок 3 5:** (А) Эксперимент 3 пересадка клубники в форме пробки, отнятая от груди, в ирландской смеси темный торф / перлит (7: 3, v / v) в туманоуловительном шкафу (Б) Заглушите растения, растущие в тепличных условиях, примерно на 4 недели дополнительным освещением (C) cv с клубничной вилкой ‘Красная слава’ от немикоризной обработки и (D) клубничная пробка cv ‘Red Glory’ привит *Claroideoglomus claroideum* через 6 недель после трансплантации 56

**Рисунок 3 6:** (А) Эксперимент 4 пересадка клубники в форме пробки, отнятая от груди в ирландской смеси темный торф / перлит (7: 3, v / v) в туманоуловительном шкафу (B) Пробковые растения выращивали в тепличных условиях в течение 7 недель 56

**Рисунок 3 7:** (А) Эксперимент 5 саженцы клубники, размноженные в ирландской смеси темный торф / перлит (7: 3, v / v) при естественной температуре и освещенности в политоннеле Обратите внимание на первые признаки покоя, которые проявляются желтыми листьями (красные стрелки) (B) Модульные лотки хранятся в холодном состоянии в темноте при температуре -2°C (C) Клубничные пробки, повторно помещенные в горшочки из аттапульгитовой глины в автоклаве, дают новые листья после одной недели в камере для выращивания при температуре 22 ° C (D) Клубничная пробка, образующая новые корни после одного месяца повторного

заливка в горшок 57

~ 11 ~

**Глава 1**

**Рисунок 3 8:** Колонизация корней грибами арбускулярной микоризы (AMF) *Fragaria* x *ananassa* plug (‘EM-1996’) после 6 недель культивирования в автоклавном вермикулите в помещении для выращивания при 22 °C (эксперимент 1) Цифры обозначают виды AMF: (1) *Воронкообразные мхи*; (2) *Rhizophagus irregularis*; (3) *Claroideoglomus Claroideum,* а соседние буквы обозначают различные микоризные структуры (a) или арбускулы (b) Буквы рядом с черными стрелками: A: арбускула, V: везикула, H: гифы, S: споры Функция масштабной шкалы была недоступна в камере, используемой для получения изображений Таким образом, вместо этого сообщается об увеличении 61

**Рисунок 3 9:** Колонизация корней грибами арбускулярной микоризы (AMF) *Fragaria* x *ananassa* plug cv ‘Vibrant’ после 8 недель культивирования в (а) кокосовой койре и (б) вермикулите в ростовой камере при 22 °C (эксперимент 2) Продольный сквош корней, окрашенных трипановым синим, колонизация одним видом AMF *Rhizophagus irregularis* Буквы рядом с черными стрелками означают A: арбускула и V: везикула (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм) 61

**Рисунок 3 10:** Колонизация корней грибами арбускулярной микоризы (AMF) *Fragaria* x *ananassa* plug cv ‘Vibrant’ (a-c) и ‘Red Glory’ (d-f) после 6 недель культивирования в ирландской смеси торф / перлит (7: 3; v / v) в теплице условия (эксперимент 3) Продольный сквош корней, окрашенных трипановым синим, колонизация отдельными видами AMF: (a, d) *Воронкообразные мхи*; (b, e) *Rhizophagus irregularis*; (c, f) *Claroideoglomus claroideum* Буквы рядом с черными стрелками: A: арбускула, V: везикула, H: гифы (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм) 62

**Рисунок 3 11:** Колонизация корней темными перегородчатыми эндофитами (DSE) *Fragaria* x *ananassa* cv ‘Elsanta’ после 7 недель выращивания в ирландской смеси темный торф / перлит (7:3; v /v) в условиях теплицы (эксперимент 4) Буквы рядом с черными стрелками: H: гифы, Mo: монолиформная клетка и Me: микросклероз (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм) 63

**Рисунок 3 12:** Процент заселения корней арбускулярными микоризными грибами (AMF, % RLC), арбускулами и пузырьками в эксперименте 1 (A-C), эксперименте 2 (D) и эксперименте 3 (E-G) Сокращения F m, R i и C c соответственно обозначают *Воронкообразные мхи*, *Rhizophagus irregularis* и *Claroideoglomus claroideum* В эксперименте 2 *R irregularis* был единственным AMF

~ 12 ~

**Глава 1**

используемые виды Образцы корней были получены от двух растений в эксперименте 2, но от отдельных растений во всех других экспериментах Колонизация AMF не наблюдалась в немикоризных контролях (Cbи / или Cb+) Столбики представляют стандартную ошибку (+ 1 SE), а n - количество оцененных повторений (для каждого лечения) Обработки, которые существенно не различались, имеют по крайней мере одну общую букву (попарные сравнения, *P* ≤ 0,05) ns указывает на отсутствие статистической значимости между видами AMF, привитыми для каждого тестируемого сорта клубники (например, Попарные сравнения, *P* ≤ 0,05) Примечание некоторые шкалы начинаются не с 0 65

**Рисунок 3 13:** (А) средний диаметр кроны растения (мм) и (Б) средняя свежая биомасса (г) в эксперименте 1 Немикоризные (NM = необработанные) обработки - белые полосы, а черные полосы представляют обработки, привитые AMF Столбики представляют среднее значение + 1 SE Для обработки NM *n* = 24 и для обработки с прививкой AMF *n* = 36 Методы лечения, которые существенно не различались, имеют по крайней мере одну общую букву (Попарные сравнения, *Р* ≤ 0,05) Обратите внимание, что весы не начинаются с 0 68

**Рисунок 3 14:** (А) Средняя сухая биомасса растений (г) в эксперименте 2 Немикоризные (NM) обработки - белые полосы, а черные полосы представляют обработки, привитые AMF Столбики представляют среднее значение + 1 SE Для обработки NM и обработки с прививкой AMF *n* = 21 Было обнаружено значительное несоответствующее взаимодействие между инокуляцией AMF и субстратом (*F*1,78 = 3,9; *P* = 0,033) ns указывает на отсутствие статистической значимости между обработкой NM и обработкой, инокулированной AMF, для каждого тестируемого субстрата (попарные сравнения, *P* ≤ 0 05) 69

**Рисунок 3 15:** (А) средний диаметр кроны растения (мм) и (Б) средняя высота растения (мм) в эксперименте 3 Немикоризные (NM) обработки - белые полосы, а черные полосы представляют обработки, привитые AMF Столбики представляют среднее значение + 1 SE Для обработки NM *n* = 20 и для обработки с прививкой AMF *n* = 27-30 Сорт оказал значительное влияние на (А) диаметр кроны (*F*1,89 = 9,5; *P* = 0,003) и (Б) высоту (*F*1,89 = 8,5; *P* = 0,004) ns указывает на отсутствие статистической значимости между обработкой NM и обработкой, привитой AMF, для каждого тестируемого сорта клубники (Попарные сравнения, *P* ≤ 0 05) 70

~ 13 ~

**Глава 1**

**Рисунок 3 16:** Колонизация корней темными перегородчатыми эндофитами (DSE) *Fragaria* x *ananassa* plug cv ‘Vibrant’ (A-C) и ‘Red Glory’ (D-F) хранятся в холоде при -2 °C в течение 2 месяцев, после 30-дневного культивирования в автоклавированной аттапульгитовой глине в ростовом шкафу при температуре 22 °C Аналогичные структуры наблюдались в корнях растений, хранившихся в холоде при температуре -2°C в течение 1, 3, 4 и 5 месяцев (данные не показаны) Буквы рядом с черными стрелками означают H: гифы, Mo: монилиформные клетки и Me: микросклероз (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм)

 73

**Рисунок 3 17:** Процентное содержание грибов арбускулярной микоризы (AMF, % RLC) и эндофитов с темными перегородками (DSE, % DSE) средние значения колонизации длины корня (± SE, *n* = 18; каждый образец корня был собран из трех отдельных растений) после различной продолжительности хранения в холодильнике (от одного до пяти месяцев) с последующим 30 d повторного выращивания в помещении для выращивания при температуре 22°C 74

**Рисунок 4 1:** Схематическое представление экспериментальной установки для изучения эффекта предварительной инокуляции грибов арбускулярной микоризы (AMF) против *Verticillium dahliae*: (А) эксперименты в теплице (эксперимент 1 и 2) и (Б) полевой эксперимент (эксперимент 3) Микропланшеты или побеги были инокулированы AMF и размножены в субстратах без почвы (Этап 1) Пробки хранили в холодном состоянии в течение семи недель при -2°C только для эксперимента 3, в то время как пробки хранили в тепличных условиях для экспериментов 1 и 2 (Этап 2) Пробки пересаживали в полевую почву, загрязненную *V dahliae* microsclerotia (Этап 3), и оценивали развитие болезни (этап 4) 89

**Рис 4 2:** клубника растения выращивали в горшках, завалило поля почвы в теплице в условиях эксперимента (А) и 1 (Б) 2 Растения земляники в эксперименте 3 выращивались в местах участки В (С) одна неделя, и (D) 15 недель после трансплантации 93

**Рисунок 4 3:** Колонизация корней грибами арбускулярной микоризы (AMF) растений земляники в эксперименте 1 (cv ‘EM-1966’) и эксперименте 2 (cv ‘Vibrant’ и ‘Red Glory’) соответственно после 25 и 27 недель выращивания в горшках, заполненных полевой почвой в теплице купе Продольное сдавливание корней, окрашенных трипановым синим, колонизация AMF, у контрольных растений без AMF (a) Cbи (b) Cb+, а также растений, предварительно инокулированных (c) *воронкообразным мхом*, (d)

~ 14 ~

**Глава 1**

*Rhizophagus irregularis* и (e) *Claroideoglomus claroideum* Буквы рядом со стрелками: A: арбускула, H: гифы, S: споры, V: пузырьки (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм) 97

**Рисунок 4 4:** Процент колонизации корней земляники (А) арбускулярными грибами микоризы (AMF, % RLC) и (Б) арбускулами в эксперименте 2 Сокращения Cb-, Cb+, F m, R i и C c обозначают контроль без AMF (Cb-), контроль без AMF с бактериальной промывкой (Cb+), *воронкообразные мхи* (F m), *Rhizophagus irregularis* (R i) и *Claroideoglomus claroideum* (C c) Бары являются стандартной ошибкой (+ 1 SE), а n - количество повторов на одно лечение Сорт клубники оказал значительное влияние на (A) % RLC (*F*1,18 = 6,53; *P* = 0,020) Обработка AMF оказала значительное влияние на (B)% арбускул (*F*4,18 = 3,08; *P* = 0,043) Обратите внимание, что одна из шкал не начинается с 0 98

*Рисунок 4 5:* Результаты обобщенных линейных моделей, соответствующих количеству растений, продуцирующих побеги, без предварительной инокуляции микоризы (контроль без AMF (Cb-) и контроль без AMF с бактериальной промывкой (Cb+)) или предварительно инокулированных отдельными видами AMF: *воронкообразные мхи* (F m), *Rhizophagus irregularis* (R i) и *Claroideoglomus claroideum* (C c) в эксперименте 1 Данные представляют собой количество растений, продуцирующих побеги (*n* = 12) Общий эффект лечения был значительным (GLM, *P* = 0,032) Методы лечения, которые существенно не отличались, имеют по крайней мере одну общую букву (попарные сравнения, *P* ≤ 0 05) 99

**Рисунок 4 6:** Симптомы увядания земляники, наблюдаемые во всех экспериментах, характеризовались увядшими листьями, коричневыми листьями и низкорослыми растениями: (a-d) эксперимент 1; (e-f) эксперимент 2; (g-i) эксперимент 3 101

**Рисунок 4 7:** Количество пораженных растений в эксперименте 3 без предварительной инокуляции микоризы (Cb+) или с предварительной инокуляцией отдельными видами AMF (*Воронкообразные мхи* (F m), *Rhizophagus irregularis* (R i) и *Claroideoglomus claroideum* (C c)) трех сортов земляники (‘Vibrant’, ‘Malling Столетие" и "Красная Слава"), через 18 недель после выращивания в полевых условиях Данные представляют собой количество больных растений (*n* = 96) Сорта клубники, которые существенно не различались, имеют по крайней мере одну общую букву (Попарные сравнения, *P* ≤ 0 05) 103

~ 15 ~

**Глава 1**

**Рисунок 4 8:** Пространственная карта *Verticillium dahliae* на земляничном поле через 18 недель после пересадки, показывающая два очага с большим количеством увядших растений на участке Панель условных обозначений представляет собой цветовой ключ для обозначения количества пораженных растений на участке Было шесть блоков (то есть шесть посадочных грядок) и 72 участка, на каждом из которых было по 16 растений (обработка AMF и сорт клубники для каждого отдельного участка не представлены для ясности) 103

**Рисунок 5 1:** (А) Измельчитель тюков загружает в машину для наполнения лотков грунтовый субстрат (т е Смесь торф / перлит / кокосовая койра: 7:2:1, в / в), здесь инокулированный коммерческим инокулятом AMF RootgrowTM (B) Заполнитель лотков Javo загрузка пластиковых лотков заливочной смесью (C) Вид пластикового лотка, заполненного заливочной смесью (D) Клубничные пробки, отлученные от груди под системой запотевания (E) Пробковые растения, выращенные в тепличных условиях через семь недель после пересадки 114

**Рисунок 5 2:** Колонизация корней грибами арбускулярной микоризы (AMF) клубничных пробок в эксперименте 2 после 21 недели (т е после 7 недель в условиях теплицы и 14 недель в темном отсеке для хранения при 2 ° C) культивирования Буквы рядом со стрелками: A: арбускула, H: гифы, V: пузырьки (красные столбики шкалы обозначают 100 мкм) 115

**Рисунок 5 3:** Растения, инокулированные *Phytophthora fragariae* в эксперименте 1 (вид только блока 4) в два разных момента времени: (А) при посадке и (Б) через три недели после посадки Больные растения увядали, и на них появлялись коричневые листья (красные стрелки) 124

**Рисунок 5 4:** Влияние добавления грибов арбускулярной микоризы (AMF) в эксперименте 1 на оценку заболевания через 35 дней после инокуляции *Phytophthora fragariae* Данные представляют собой общее количество (*n* = 40) растений в каждой из следующих категорий заболеваний: 1 - отсутствие симптомов, 2 - опавшая листва, 3 - полностью разрушенные и мертвые Белыми полосами показаны растения, инокулированные микоризой при посадке (AMF+, т е обработка M и M+P), а черными полосами показаны растения без микоризы (AMF-, т е обработка P и Cb) 124

**Рисунок 5 5:** Растение, инокулированное *Phytophthora cactorum* в эксперименте 3 (повторение 1) через семь недель после инокуляции патогеном: (А) сильно увядшее растение и (Б) наблюдение некроза кроны (уровень 4, см Раздел 5 2 5) 125

~ 16 ~

**Глава 1**

**Рисунок 5 6:** Резюме клубники Растения ‘Malling Centenary’ в эксперименте 4, выращенные в мешках из кокосовой койры, через 13 недель после посадки 126

**Рисунок 5 7:** Средняя урожайность плодов растения I класса (А) и средняя масса свежего побега растения (Б) Обработками были пробки, инокулированные во время посадки AMF (M), PGPR (P), как AMF, так и PGPR (M+P), и отрицательный контроль без добавления AMF или PGPR (Cb-) Обратите внимание, что шкалы не начинаются с 0 Методы лечения, которые существенно не различались, имеют по крайней мере одну общую букву (Попарные сравнения, *Р* ≤ 0,05) Обратите внимание, что весы не начинаются с 0 126

**Рисунок 6 1:** Схематическое представление экспериментальной установки для изучения взаимодействия грибов арбускулярной микоризы (AMF) и *Verticillium dahliae* или *Phytophthora fragariae* при культивировании in vitro: (1) микропланты клубники укореняли на модифицированной среде Strullu Romand (MSR); (2) затем микропланты инокулировали коммерческим стерильным *Rhizophagus irregularis* споры; (3) микропланты инокулировали пробками среды, заросшими патогенным мицелием, и (4) оценивали тяжесть заболевания в дополнение к AMF или колонизации корней патогеном 133

**Figure 6 2:** Рисунок 6 2: Фотография, изображающая квадратные пластины эксперимента 2, инкубированные в помещении для выращивания при 15-16°C после инокуляции проростков *Phytophthora fragariae* гиф-пробками Phytophthora fragariae 137

**Рисунок 6 3:** (А) *Fragaria vesca* и (Б) *F* x *ananassa* cv саженцы ‘Calypso’ с хорошо развитой корневой системой и здоровыми побегами после одного месяца культивирования на модифицированной среде Strullu Romand (MSR) в аксенных условиях 139

**Рисунок 6 4:** Проросшие *Rhizophagus irregularis* споры Rhizophagus irregularis (черная стрелка = микоризные гифы) на модифицированной среде Strullu Romand (MSR) Фотографии были сделаны после двух месяцев культивирования в аксенических условиях с (А) *Fragaria vesca* и (Б) *F* x *ananassa* cv ‘Калипсо’ саженцы Масштаб не был доступен в камере, используемой для получения изображения, поэтому вместо этого сообщается увеличение 139

**Рисунок 6 5:** (А) *Fragaria vesca* саженцы Fragaria vesca, инокулированные гиф-пробками *Verticillium dahliae* и (Б) *саженцы F* x *ananassa* cv ‘Calypso’, инокулированные гиф-пробками *Phytophthora fragariae*

~ 17 ~

**Глава 1**

через 5 недель после прививки патогена Оба патогена могли распространяться и закрепляться на поверхности модифицированной среды Струллу Романа (MSR) (черными стрелками выделены области, где мицелий рос вокруг мицелиальных пробок) 140

**Рисунок 6 6:** Симптомы заболевания (А) *Fragaria vesca* проростков Fragaria vesca, инокулированных *Verticillium dahliae*, и (Б) *проростков F* x *ananassa* cv ‘Calypso’, инокулированных *Phytophthora fragariae*, через 5 недель после инокуляции патогеном Продольные вырезки из корня ‘Калипсо’ (C) и (D) оставляют черешок, окрашенный трипановым синим, что показывает наличие *P fragariae* ооспор P fragariae (красные стрелки) Черные полосы шкалы обозначают 100 мкм 141

**Рисунок 6 7:** Влияние инокуляции патогеном на показатель заболеваемости (А) *Fragaria vesca* саженцев Fragaria vesca, инокулированных *Verticillium dahliae*, и (Б) *саженцев F* x *ananassa* cv ‘Calypso’, инокулированных *Phytophthora fragariae*, через 5 недель после инокуляции патогеном Данные представляют собой общее количество (n = 40) растений в следующих категориях болезней: 0 - без симптомов, 1 - побег с одним листом, проявляющим симптомы, 2 - до 25% листьев с симптомами, 3 - до 50% листьев с симптомами, 4 – до 75% листьев, проявляющих симптомы, и 5 - гибель растений Белые полосы показывают растение, зараженное патогеном (увядание + или фитофтора +), а черные полосы показывают растения без патогенов (увядание или фитофтора-) 142

**Рисунок 7 1:** Обзор влияния арбускулярных микоризных грибов (AMF) на здоровье и продуктивность клубники в системах выращивания Гипотезы отображаются как ‘принятые’, ‘отклоненные’ или подтвержденные / отклоненные "подлежащие подтверждению’ Гипотезы изложены не полностью для ясности (раздел 7 1) 147

~ 18 ~

**Глава 1**

**Благодарности**

Я хочу поблагодарить двух моих руководителей, профессора Сянмина Сюя (NIAB EMR) и доктора Анджелу Ходж (Йоркский университет) за все их время и руководство на протяжении всего моего докторского проекта Они помогли мне развиваться как независимому исследователю Я также хотел бы поблагодарить членов моей учебной группы из Йоркского университета, профессора Сью Хартли и профессора Нила Брюса, которые помогали направлять мои исследования и проводили отличные дискуссии Я хотел бы поблагодарить AHDB за предоставление финансирования для этого очень интересного проекта Я хочу поблагодарить Plantworks Ltd за предоставление бесплатных прививок AMF и PGPR, используемых в моем докторском проекте, а также за их техническую поддержку и мотивацию, в то же время постоянно напоминая мне о важности полезных микробов в ‘реальном мире садоводства’

Я в долгу перед моими друзьями и коллегами из NIAB EMR и Йоркского университета: вы сделали это время очень веселым и всегда были рядом со мной во многих отношениях Особая благодарность Джойс Робинсон, доктору Луизе Бойер, доктору Тому Пасси, доктору Хелен Кокертон, доктору Жюльену Лекурту, доктору Фэн Вэй и доктору Шарлотте Неллист за их помощь в лаборатории и теплице, без которых эксперименты, проводимые на последних этапах моей докторской диссертации, были бы практически невозможны и намного менее весело Я также благодарю доктора Фила Брейна за его терпение во всех частях этого проекта, связанных со статистикой Я хотел бы поблагодарить доктора Роберта Джонса за полезные комментарии, сделанные по этому тезису

Наконец, я хотел бы поблагодарить моих терпеливых друзей Райана и Андреаса, которые поддерживали меня в это трудное время Я, конечно, не стал бы получать докторскую степень, не говоря уже о том, чтобы зайти так далеко без моей мамы, папы и моей сестры Кэролайн; вы всегда рядом со мной с вашей бесконечной поддержкой, ободрением и терпением

~ 19 ~

**Глава 1**

**Заявление авторов**

Я, Бенджамин Лангендорф, заявляю, что весь материал, содержащийся в этой диссертации, за исключением работы, изложенной ниже, является результатом моей собственной работы и был написан исключительно мной Эта работа ранее не была представлена на соискание премии ни в этом, ни в каком другом университете Все источники признаются в качестве ссылок Для всех экспериментов уход за растениями (полив/ подкормка) был спланирован Бенджамином Лангендорфом и проведен как Бенджамином Лангендорфом, так и Джойс Робинсон Отбор образцов корней, окрашивание корней и закрепление корней на предметных стеклах проводили Бенджамин Лангендорф и Джойс Робинсон, но подсчет колонизации проводился Бенджамином Лангендорфом Полевой эксперимент, описанный в главе 4, был разработан Бенджамином Лангендорфом, но организован с помощью доктора Фэн Вэя Эксперименты, описанные в главе 5, были разработаны Бенджамином Лангендорфом, но проведены с помощью Джойс Робинсон, Тома Пасси и доктора Луизы Бойер Все расчеты и статистический анализ были проведены докторами Филом Брейном и Бенджамином Лангендорфом

Benjamin Langendorf

Йоркский университет

Август 2017 года

~ 20 ~

**Глава 1**

**Глава 1 Общее введение**

**1 1 *Fragaria* x *ananassa* в коммерческом садоводстве**

Коммерческая клубника (*Fragaria* x *ananassa* Duch) - многолетняя культура, относящаяся к семейству *Rosaceae* розоцветных Он происходит от помеси *F virginiana* и *F chiloensis* (Hancock, 1999) Клубника является важной садоводческой культурой во всем мире с точки зрения ее коммерческой, пищевой и лекарственной ценности (Hancock, 1999) Согласно статистике ФАО, общая глобальная площадь земель, используемых для выращивания клубники, в 2014 году составила 373 435 га (ФАО, 2017) Только в Великобритании выращивание клубники в 2014 году составило около 4500 га земли с урожайностью около 23 т га-1 (ФАО, 2017) На долю клубники приходилось 78% всего производства мягких фруктов в Великобритании, что в 2016 году оценивалось в 253 миллиона фунтов стерлингов (DEFRA, 2017), и ожидается, что в ближайшие несколько лет этот показатель значительно возрастет (Boyer *et al ,* 2016)

Пересадку клубники обычно получают путем микроразмножения с использованием меристем или вегетативного размножения с использованием верхушек или черенков побегов клубники С начала 1990-х годов укорененные модульные растения, называемые клубничными пробками, стали наиболее часто используемым посадочным материалом в Европе (Durner *et al* , 2002) В настоящее время на смену пересадкам с голыми корнями, которые обычно убираются с поля зимой, приходят пересадки с пробками Популярность пересадки в виде пробки в основном объясняется тем фактом, что клубнику с голыми корнями труднее хранить в течение длительного периода из-за отсутствия субстрата вокруг корней и из-за того, что они часто заражаются корневыми патогенами (Lieten, 2000; Durner *et al* , 2002) Производство клубничных пробок обычно происходит в период с июля по август и делится на несколько этапов Сначала у материнских растений, которые активно продуцируют столоны, собирают некорневые верхушки побегов с корневыми колышками Верхушки высаживают в ячейки специально сконструированных пластиковых лотков, обычно заполненных смесью торфа и перлита Затем эти кончики обрабатывают под опрыскиванием не менее двух недель, чтобы дать возможность укорениться Как только кончики побегов укоренятся, они вызываются

~ 21 ~

**Глава 1**

заглушки Затем пробки обычно выдерживают еще четыре недели в тепличных условиях, чтобы они выросли и укрепили корневую систему Наконец, пробки готовы к транспортировке, пересадке или хранению в холодильнике Перед пересадкой клубничные пробки обычно хранят в холоде при температуре -2 ° C в течение различного периода времени (в среднем четыре месяца), чтобы добиться достаточного охлаждения для образования цветочных почек и планирования обрезки (Lieten *et al* , 2005)

Клубника обычно предпочитает солнечные места с хорошо дренированными супесчаными почвами с оптимальным диапазоном рН 5,5-7,0 (Hancock, 1999) В Великобритании клубнику обычно выращивали на открытых полях в рядах и на приподнятых грядках вплоть до 1991-1992 годов (Carter *et al* , 1993) К концу 1990-х годов все более распространенными стали защищенные настольные системы возделывания с использованием беспочвенных субстратов, на которые сегодня приходится две трети всех посевных площадей клубники в Великобритании и более 50% от общей площади беспочвенных посевов в Европе (Boyer *et al* , 2016; Лопес-Аранда *et al*и др , 2016)

В Великобритании выращивается много сортов, в том числе ‘Vibrant’, ‘Elsanta’, ‘Red Glory’ и ‘Malling Centenary’ Сорта клубники обычно можно разделить на две категории: а) июньские сорта с коротким днем, которые могут расти и распускать цветочные почки в течение короткого светового дня, давая единичный, но большой урожай, и б) вечнозеленые сорта с длинным днем, нечувствительные к свету, дающие плоды в течение гораздо более длительного периода времени (обычно 4-5 месяцев; Хэнкок, 1999) Клубника богата витамином С, фенольными соединениями (например, антоцианами) и минералами, такими как калий и марганец (Debnath & Teixeira da Silva, 2007) Красный цвет клубники обусловлен антоцианами, пеларгонидин-3-глюкозидом и цианидин-3-

глюкозид (Дебнат и Тейшейра да Силва, 2007) Лекарственная ценность клубники обусловлена высоким содержанием в ней фенольных соединений, которые, как сообщается, оказывают противораковое, антиоксидантное и противовоспалительное действие (Debnath & Teixeira da Silva, 2007; Giampieri *et al* , 2013)

~ 22 ~

**Глава 1**

**1 2 Болезни клубники и борьба с ними**

Грибковые патогены являются основной причиной заболевания клубники (Sigee, 2005) В Европе к основным грибковым патогенам клубники относятся: *Verticillium dahliae* Kleb (приводит к увяданию клубники), *Phytophthora fragariae* (вызывает красную сердцевину или красную стелу), *Phytophthora cactor* (вызывает гниль кроны), *Podosphaera aphanis* (вызывает мучнистую росу) и *Botrytis cinerea* (вызывает серую плесень; Парикка, 2004) Для уменьшения потерь урожая, вызванных этими патогенами, применяются различные меры контроля (например, методы выращивания, селекция, севооборот и использование пестицидов и биоцидов) (Guerena & Born, 2007)

В полевых условиях почвенный патоген *Verticillium dahliae представляет* серьезную угрозу для клубники, растущей в полевых условиях (Pegg & Brady, 2002), а Европейская и Средиземноморская организация по защите растений (ЕОКЗР) включила *Verticillium* spp в список "основных болезней клубники" (Garrido *et al* , 2011) Он образует конидии и микросклероции, которые могут прорастать в присутствии корневого экссудата и проникать в растение через первичные корни или раны *Затем* Вертициллиум проникает в сосудистые ткани корней и кроны, лишая листья и стебли воды и вызывая симптомы увядания (Bhat & Subbarao, 1999; Lovelidge, 2004) Также наблюдаются другие симптомы, такие как красновато-желтые листья, скручивающиеся вдоль средней жилки, и задержка роста Патоген зимует в почве в виде микросклероций на мертвых тканях растений Микросклероции могут оставаться жизнеспособными в течение 10 и более лет даже в отсутствие растения-хозяина (Pegg & Brady, 2002)

Ранее для борьбы с увяданием земляники регулярно применялся почвенный фумигант бромистый метил (MB) Однако в 2008 году MB был запрещен в Европе из-за его высокого озоноразрушающего потенциала, но его химические альтернативы, 1,3-дихлорпропен и хлорпикрин, сталкиваются с неопределенным будущим из-за потенциальных изменений в законодательстве (López-Aranda *et al* , 2016) Поэтому срочно необходимы альтернативные методы борьбы *с V dahliae*

~ 23 ~

**Глава 1**

(Клостерман *и др* , 2009) Различные стратегии, такие как биофумигация, соляризация, посевы уловистых / покровных культур, анаэробное обеззараживание почвы и севооборот, способствуют борьбе с болезнями, но они обычно не так эффективны, как химические фумиганты (Tahmatsidou *et al* , 2006; Korthals *et al* , 2014; Лопес-Аранда *et al*и др , 2016) Следовательно, были предприняты значительные усилия по поиску других экономически эффективных альтернатив для смягчения угрозы увядания земляники (Martin, 2003; Goicoechea *et al* , 2010) В настоящее время изучаются два основных метода снижения риска почвенных заболеваний клубники в Великобритании Первый предложенный способ основан на использовании полезных микробных организмов против корневых патогенов земляники путем введения средств биологического контроля при посадке или во время размножения Поэтому ожидается, что достаточная колонизация клубничных корней перед пересадкой усилит положительное влияние инокулированных полезных микробов на здоровье растений Второй подход заключается в отказе от традиционной обработки почвы в полевых условиях в пользу настольных систем, где растения клубники выращиваются на беспочвенных субстратах (Boyer *et al* , 2016) Этот второй подход все чаще применяется в Великобритании, и более 66% производства клубники в Великобритании в настоящее время производится на беспочвенных субстратах, обычно из кокосовой койры (кокосовое волокно), и в основном в полиэтиленовых туннелях или в теплицах на настольных системах (López-Aranda *et al* , 2016) Использование беспочвенных субстратов в коммерческом производстве клубники также имеет несколько существенных преимуществ, в том числе: снижение затрат на сбор урожая, лучший контроль режимов фертигации и опыления, а также возможность продлить вегетационный период и снизить риск заражения *V dahliae* (Boyer *et al* , 2016) Однако субстраты без почвы обычно лишены полезных микробов, в то время как корневые патогены, такие как *P fragariae* и *P cactorum*, продолжают представлять серьезную угрозу (Schnitzler, 2004; Martínez *et al* , 2010), поскольку они могут заразить посадочный материал в питомниках, если водоснабжение загрязнено (Durner *et al ,* 2002) Кроме того, эта практика опирается на высокие затраты воды и питательных веществ в результате фертигации, которые, по оценкам, более чем в два раза превышают затраты на выращивание полевых культур (Boyer *et al* , 2016)

~ 24 ~

**Глава 1**

Следовательно, инокуляция полезных микробов в беспочвенный субстрат предлагает потенциальное средство как для повышения устойчивости растений к корневым патогенам, так и для снижения расхода удобрений и воды (Boyer *et al ,* 2016)

**1 3 Роль грибов арбускулярной микоризы**

Арбускулярные микоризные грибы (AMF) распространены повсеместно и образуют облигатные симбиозы с более чем 75% всех сосудистых растений (Smith & Read 2008) Происхождение и дивергенция AMF датируются более чем 480 миллионами лет, и считается, что симбиоз AMF способствовал адаптации первых наземных растений к наземной среде (Pozo *et al* , 2013; Schüßler & Walker, 2011) AMF принадлежат к типу *Glomeromycota* (разделены на пять отрядов: *Glomerales*, *Gigasporales*, *Archaeosporales*, *Paraglomerales* и *Diversisporales*) и обладают очень специфическими биологическими и генетическими признаками (Schüßler & Walker, 2011) В течение многих лет AMF считались бесполыми Однако недавняя идентификация дикариотоподобных *изолятов Rhizophagus irregularis* и открытие локусоподобной области типа спаривания (MAT) в его геноме в совокупности предполагают потенциальное существование спаривания AMF (Corradi & Brachmann, 2016) Также было показано, что последовательности внутри отдельных спор AMF представляют множество вариантов, а также внутри и между видами типа *Glomeromycota* (Rodriguez *et al ,* 2015)

Колонизация AMF может быть инициирована тремя основными типами черенков: спорами, внерадикальными гифами и колонизированными фрагментами корня Когда ростки AMF приближаются к корню хозяина (асимбиотическая стадия), происходит обмен сигналами молекул между растением и грибами, и активируются несколько регуляторных генов растений и грибов (Pozo *et al* , 2013) AMF реагирует на присутствие корней растения интенсивным ветвлением гифы (пре

симбиотическая фаза) Было идентифицировано, что стриголактоны, содержащиеся в экссудатах корня хозяина, являются сигнальными соединениями, которые индуцируют ветвление гифов AMF и дыхание (Besserer *et al*

~ 25 ~

**Глава 1**

*al*др , 2006) Когда гифы AMF, наконец, вступают в контакт с корнем растения, образуется гифоподий (или аппрессориум), что знаменует начало симбиотической фазы, которая заканчивается образованием арбускул, где, как считается, происходит большая часть обмена питательными веществами между растением-хозяином и AMF (Smith & Read, 2008; Wang *et al*и др , 2017) Обнаружено, что AMF связаны с несколькими ключевыми семействами сельскохозяйственных культур (например*Gramineae*, *злаковыми*, *пальмовыми, бобовыми* и *розоцветными*), включая некоторые виды деревьев и многие овощные и декоративные растения (Prakash *et al* , 2015) AMF колонизируют кору корня и производят внерадикальные гифы, которые специализируются на приобретении минеральных питательных веществ и увеличивают поверхность обмена между корнем и окружающей почвой (Smith & Read, 2008) Ассоциации AMF представляют большой интерес для сельского хозяйства и садоводства Фактически, AMF может помочь растениям увеличить поглощение питательных веществ, особенно малоподвижных фосфатных ионов AMF также может помочь растениям переносить засуху и токсичность металлов, а также атаки патогенов и травоядных как над, так и под землей (Smith *et al* , 2010; Prakash *et al* , 2015) Совсем недавно было показано, что AMF активно помогают растениям поглощать азот и цинк (Hodge & Fitter, 2010; Prakash *et al* , 2015) В свою очередь, AMF получают углерод от связанного с ними растения-хозяина Важность AMF в росте и развитии сельскохозяйственных культур становится все более очевидной, и в настоящее время AMF признаны жизненно важным компонентом агроэкосистем Традиционно считалось, что роль AMF заключается только в обеспечении питательными веществами Однако в настоящее время признано, что AMF вносят более широкий спектр преимуществ для своего растения-хозяина, а также играют важную роль в экосистемных услугах (Gianinazzi *et al* , 2010; Smith *et al* , 2010) Одним из таких преимуществ является грунтование, стимулирование или иное улучшение защиты растений от атак патогенов и/или насекомых (Pozo *et al* , 2013)

**1 4 Взаимодействие между strawberry и AMF**

Самое старое описание структур AMF в корнях клубники было опубликовано в 1924 году (Jones, 1924), в то время как первое подробное описание взаимодействия AMF с клубникой было сделано

~ 26 ~

**Глава 1**

О'Брайан и Макнотон (1928), которые рассматривали AMF как корневой патоген и считали его основной причиной ланаркширской клубничной болезни В 1953 году Мосс стал первым исследователем, описавшим гифальные связи между спорами и корнями земляники (Mosse, 1953) Это исследование Мосса было проведено в East Malling Research (ныне NIAB EMR), где и проводился текущий проект С 1924 по 2017 год было опубликовано около 150 публикаций, посвященных взаимодействию клубники и AMF В большинстве этих исследований сообщалось о благотворном влиянии симбиоза AMF на растения земляники: (а) повышенная окраска плодов и концентрация фенольных соединений (Plenchette *et al ,*

1983; Castellanos-Morales *et al* , 2010), (b) увеличение производства побегов (Niemi & Vestberg, 1992), (c) увеличение урожая ягод (Boyer *et al* , 2016) и (d) улучшение качества плодов (Lingua *et al* , 2013) Также было показано, что инокуляция AMF увеличивает как рост (площадь кроны, корней и листьев), так и устойчивость к водному стрессу у размноженных растений земляники (Borkowska, 2002) Колонизация AMF перед трансплантацией микроразмноженной клубники также помогла растениям переносить водный стресс на стадии отъема (Hernández-Sebastià *et al* , 1999) Наконец, было показано, что прививка AMF снижает

заболеваемость различными патогенами корней клубники (*Murphy*et al , 2000; Вестберг и др , *et al ,* 2004; *et al* Совик и др , 2016) и даже снижение выживаемости личинок и биомассы черного виноградного долгоносика (Gange, 2001)Интересно, что в литературе имеется ограниченное количество сообщений о нейтральном эффекте и убедительном негативном влиянии прививки AMF на здоровье и/или продуктивность клубники (O'Brian & Mcnaughton, 1928; Nemec, 1974; Bååth & Hayman *et al* , 1984; Вестберг *и др ,* 2004) Может ли это быть предвзятостью в отчетности или доказательством того, что прививка AMF имеет большой потенциал для использования в качестве средства биоконтроля и / или в качестве биоудобрения при выращивании клубники? Таким образом, клубника, по-видимому, является идеальной системой выращивания для изучения степени, в которой культивирование и / или методы выращивания влияют на формирование симбиоза AMF и его функционирование Однако несколько существенных

~ 27 ~

**Глава 1**

вопросы, касающиеся экологических и молекулярных аспектов этого взаимодействия, еще предстоит решить

Модельное растение *Medicago truncatula* было полезной системой для исследования симбиотических взаимодействий AMF на молекулярном уровне (Rose, 2008), но до сих пор не существует стандартного не бобового модельного растения Земляника лесная *F vesca* может быть предложена в качестве универсальной растительной модели для исследования молекулярных аспектов симбиоза AMF в плодовых культурах, принадлежащих к семейству *Rosaceae* розоцветных Фактически, земляника лесная - это травянистое многолетнее растение с небольшим геномом (240 Мб), который был секвенирован в 2011 году, поддается генетической трансформации и имеет значительную идентичность последовательности с *F* x *ananassa*, а также с другими экономически важными розоцветными культурами и декоративными растениями (например, яблоками, грушами, персиками, абрикосами, малиной, розами; Шулаев *и др* , 2011)

**1 5 Болезни корней растений, контролируемые AMF**

Болезни корней растений, вызываемые почвенными патогенами (включая грибы, нематоды и бактерии), на сегодняшний день труднее всего поддаются контролю (Koike *et al ,* 2003) Сообщалось о важности AMF для защиты растений от почвенных патогенов на различных культурах, включая клубнику (Cano, 2014; Prakash *et al* , 2015) Например, инокуляция AMF при посадке повышала устойчивость растений земляники к *V dahliae* (Ma *et al* , 2004; Tahmatsidou *et al* , 2006; Sowik *et al* , 2016) Инокуляция AMF также снижала заболеваемость *P cactorum* и/или *P fragariae* (Norman *et al* , 1996; Murphy *et al* , 2000; Вестберг *и др ,* 2004)Кроме того, аналогичные защитные эффекты были отмечены и у других культур (например, помидоров, картофеля, баклажанов и

хлопок), и различные аспекты этой концепции были подробно рассмотрены (Borowiez, 2001; Whipps, 2004; St-Arnaud & Vujanovic, 2007; Akhtar & Siddiqui, 2008; Pozo *et al*и др , 2013) Хотя были предложены различные механизмы для защиты от почвенных патогенов, они все еще плохо изучены, особенно в отношении

~ 28 ~

**Глава 1**

для: (a) подавления роста патогенов, (b) компенсации ущерба, (c) увеличения развития ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR) и / или подавляющих микробную популяцию, (d) увеличения поглощения питательных веществ, (e) конкуренции за фотосинтез, (f) конкуренции за экссудаты, внешние по отношению к корню, (g) конкуренция за места колонизации/заражения, (h) индуцирование гормональных изменений растений, (i) индуцирование изменений в морфологии корней, характере ветвления и/или экссудации корней и (j) индуцирование системной резистентности (ISR) и/или изменений, связанных с механизмами защиты растений, (Pozo *et al* , 2002; Уиппс, 2004; Позо *et al*и др , 2013)

В целом, ожидается, что инокуляция ризосферы растений земляники AMF усилит защиту от биотических и абиотических стрессов (Вестберг и *др* , 2004; Бойер *и др* , 2016) Клубника - идеальная производственная система для изучения благотворного воздействия AMF, потому что посадочный материал (микропрепараты или побеги) можно легко привить во время их размножения и / или при посадке

**1 6 Факторы, ограничивающие создание AMF при коммерческом производстве клубники**

Несмотря на то, что за последнее десятилетие доступность коммерческих инокулятов AMF увеличилась, продукты AMF по-прежнему редко используются в коммерческом садоводстве Существует несколько факторов, которые могут ограничить использование AMF в коммерческом производстве клубники и других культур: (a) трудности с получением высококачественных инокулятов AMF в больших количествах, (b) высокая стоимость для производителей, (c) переменный положительный эффект, (d) неопределенность в отношении преимуществ добавления AMF в наличие местных популяций AMF и (e) нежелание производителей рисковать низким производством из-за сокращения внесения удобрений и пестицидов, которые часто необходимы для функционирования симбиоза (Ryan & Graham, 2002; Boyer *et al ,* 2016)

~ 29 ~

**Глава 1**

Многие методы садоводства, а также условия окружающей среды также могут влиять на результат симбиоза с точки зрения продуктивности растений и защиты от болезней корней (Johnson & Pfleger, 1992) Некоторые характеристики искусственных питательных сред и субстратов, обычно используемых в питомниках клубники, могут влиять на формирование и / или эффект симбиоза AMF (Azcon-Aguilar & Barea, 1997; Boyer *et al* , 2016) Например, сообщалось, что некоторые виды торфа оказывают негативное влияние на колонизацию корней AMF саженцев земляники*in vitro* , полученных in vitro, во время размножения (Niemi & Vestberg, 1992; Vestberg *et al* , 2000; Corkidi *et al* , 2004; Palencia *et al* , 2013) Однако остается неясным, было ли негативное влияние торфа на колонизацию AMF вызвано высоким содержанием удобрений (например, фосфора), высокой влажностью во время фазы размножения и / или биологическими свойствами самого торфа (Martinez *et al* , 2013; Palencia *et al* , 2013) Поскольку большинство побегов клубники укореняются в среде на основе торфа (Durner *et al* , 2002), поэтому необходимы тесты, чтобы проверить, могут ли побеги клубники быть предварительно колонизированы AMF в таких условиях

Более того, режим с высоким содержанием удобрений, обычно используемый при коммерческом производстве клубники, может препятствовать установлению симбиоза AMF Например, для нескольких культур было продемонстрировано, что увеличение количества растворимых фосфорных удобрений снижает общий уровень колонизации AMF (Barea, 1991) Сообщалось также, что избыток азотных удобрений снижает колонизацию корней AMF у клубники и других культур (Azcon-Aguilar 1997; Salgado-Barreiro *et al* , 2012) Поэтому режим внесения удобрений следует скорректировать для достижения максимального урожая клубники и поддержания колонизации AMF

Помимо влияния питательных сред и внесения удобрений на AMF, другие методы выращивания клубники могут повлиять на способность AMF устанавливать симбиоз Среди них методы орошения (например, запотевание), хранение саженцев в холодильнике и пестициды

~ 30 ~

**Глава 1**

применение Размножители растений или системы опрыскивания должны поддерживать влажные условия не менее двух недель, чтобы обеспечить акклиматизацию и укоренение верхушек клубники (Durner *et al* , 2002; Treder et *al* , 2015) Некоторые данные свидетельствуют о том, что колонизация корней AMF может быть ограничена во влажных условиях из-за более низкой доступности кислорода, что снижает выживаемость побегов AMF и колонизацию корней (Thormann *et al* , 1999; Miller, 2000) Перед пересадкой клубничные пробки необходимо хранить в холоде при температуре -2 ° C в течение различного периода времени Потенциальные последствия длительного хранения в холодильнике при низких температурах для выживания и инфекционности ростков AMF (т е спор, колонизированных корней и внерадикальных гифов) в корневом шарике клубничных пробок неизвестны Однако в нескольких исследованиях было высказано предположение, что *побеги AMF* видов Glomus обладают способностью переносить холод, включая зимние заморозки (Safir *et al* , 1990; Addy *et al* , 1994; Addy *et al* , 1997; Kabir *et al* , 1997; Addy *et al* , 1998; Klironomos *et al* , 2001; Juge *et al* , 2002) Поэтому необходимо провести тесты для изучения устойчивости к замораживанию AMF, колонизирующих корни клубники

Традиционное производство клубники обычно требует большого количества пестицидов, которые могут повлиять на установление симбиоза AMF и / или его функционирование Состав пестицидов, применяемые дозы, применяемая комбинация, методы внесения, типы субстратов, условия выращивания, системы возделывания и виды AMF в системе могут опосредовать влияние, которое пестициды могут оказывать на симбиоз AMF (Johnson & Pfleger, 1992) Таким образом, не существует общих правил относительно влияния пестицидов на симбиоз AMF Было показано, что некоторые пестициды (например, каптан) совместимы или даже стимулируют развитие мицелия AMF в субстратах для садоводства (Lovato *et al* , 1995) Напротив, внекорневое внесение фосетил-Al (фосетилалюминия) на клубнику уменьшало колонизацию корней AMF в эксперименте с горшками (Mark & Cassells, 1999)

~ 31 ~

**Глава 1**

Будущие исследовательские усилия должны быть сосредоточены на понимании результатов взаимодействия между видами (или штаммами) AMF и методами выращивания, чтобы подтвердить, имеют ли AMF большой потенциал для использования в качестве биоконтрольного агента и / или биоудобрения в различных системах выращивания клубники и других садовых культур Результаты такого рода исследований помогут производителям выбрать наилучшие комбинации видов AMF (или изолятов) и методы культивирования, чтобы максимизировать положительный эффект AMF во время размножения и / или после пересадки

**1 7 Цели проекта**

Устойчивое садоводство стало важным вопросом в повестке дня глобальных правительств и политиков Растущие требования к водоснабжению, землепользованию, удобрениям и пестицидам приводят к растущей озабоченности по поводу глобальной продовольственной безопасности и воздействия на окружающую среду (Gianinazzi *et al* , 2010; Fitter, 2012) Клубника является важной садоводческой культурой во всем мире, обладающей высокой экономической, питательной и лечебной ценностью Тем не менее, почвенные патогены, такие как *V dahlia*, *P fragariae* и *P cactorum*, представляют серьезную угрозу для производства клубники, особенно с тех пор, как почвенный фумигант бромистый метил был запрещен в Европе из-за его высокого озоноразрушающего потенциала и риска для здоровья человека (Ristaino & Thomas, 1997; Martin, 2003) Кроме того, производство клубники в настоящее время переходит к выращиванию на таких субстратах, как торф и кокосовая койра, которые обычно лишены полезных микробов, таких как AMF; поэтому внесение AMF и / или PGPR в субстраты без почвы с большей вероятностью принесет пользу (Boyer *et al* , 2016) Ассоциации AMF многофункциональны, помогая растениям усваивать питательные вещества и воду, и они могут действовать как агенты биоконтроля, защищая корни от патогенов Что наиболее важно, чем раньше установлена колонизация AMF, тем больше выгода (Azcón-Aguilar & Barea, 1997) В этом контексте раннее внесение достаточного количества AMF для создания первоначального размножения и последующего посадочного материала

~ 32 ~

**Глава 1**

в детских садах это может быть полезной стратегией В случае успеха предварительная прививка AMF может стать неотъемлемой частью производства клубники в ближайшем будущем

Тем не менее, несколько исследований выявили вариабельность благотворного воздействия AMF на корневые патогены разных культур (Akhtar & Siddiqui, 2008) Например, было показано, что воздействие AMF на корневые патогены различается у разных видов AMF, а также у разных болезней корней (Whipps, 2004) Кроме того, такие подавляющие заболевание эффекты могут дополнительно зависеть от субстратов, сортов-хозяев и методов управления посевами (Baum *et al* , 2015) Таким образом, все еще имеются ограниченные знания о взаимодействии между AMF, сортами клубники и корневыми патогенами, а также о механизмах, лежащих в основе биологической защиты, вызванной AMF, в коммерческих условиях

В попытке восполнить эти пробелы в знаниях, в настоящем исследовании использовалась ассоциация AMF-strawberry в качестве модельной системы для изучения возможности предварительной колонизации клубничных пробок для повышения устойчивости к основным болезням корней клубники и / или повышения урожайности клубники В частности, была проведена серия экспериментов либо в контролируемых условиях, либо в условиях открытого поля, чтобы исследовать следующие гипотезы

(Рис 1 1):

• H1: Возможно наносить инокулят AMF во время уборки клубники на различные субстраты без почвы в условиях запотевания и получать клубничные пробки с высокой колонизацией AMF (Глава 3)

• H2: AMF в колонизированных клубничных корнях может выдержать длительный период хранения при температуре -2 ° C (Глава 3)

• H3: предварительная колонизация клубничных пробок AMF повышает устойчивость растений к *V*  *dahlia* в условиях теплицы и открытого грунта (Глава 4)

~ 33 ~

**Глава 1**

• H4: предварительная колонизация AMF и / или инокуляция AMF и / или PGPR при посадке повышает устойчивость растений к *P fragariae* и *P cactorum* в беспочвенных субстратах (Глава 5)

• H5: Прививки AMF и / или PGPR повышают урожайность клубники в кокосовых мешках в тепличных условиях (Глава 5)

• H6: В попытке контролировать влияние изменяющихся условий окружающей среды, которые возникают как в полевых, так и в тепличных условиях*, можно создать простую* автотрофную систему in vitro и использовать ее в качестве инструмента для исследования различных аспектов взаимодействия клубники, AMF-патогена (Глава 6)

~ 34 ~

**Глава 1**



**Рисунок 1 1:** Обзор рассмотренных систем выращивания клубники и шести гипотез Гипотезы изложены не полностью для ясности (раздел 1 7)

~ 35 ~

**Глава 2**

**Глава 2 Общие методы**

**2 1 Инокулят грибов арбускулярной микоризы**

**2 1 1 Источник инокулята и инокуляция**

Чистые культуры пяти видов AMF (таблица 2 1) и коммерческую смесь тех же пяти видов получали от Plantworks Ltd, Кент, Великобритания, в виде смеси аттапульгитовой глины/пемзы/цеолита, содержащей споры, мицелий и фрагменты корней колонизированных растений-хозяев Для клубничных пробок инокулят AMF вводили в виде слоя порошка, содержащего 10% (в/в), и наносили примерно на 1 см ниже поверхности горшечного субстрата перед пересадкой побегов клубники Показано, что использование разных видов AMF и даже разных изолятов одного и того же вида оказывает различное благотворное воздействие на одно и то же растение-хозяина из-за их различных экологических стратегий (Rodriguez & Sanders, 2015) Тем не менее, связь между функцией и таксономией видов AMF все еще остается плохо изученной темой (van der Heijden *et al* , 2004) Таким образом, виды AMF, использованные в этом исследовании, были в первую очередь отобраны из-за их коммерческой доступности и из-за благотворного влияния на урожайность клубники, о котором сообщалось в предыдущей работе (Boyer *et al* , 2016) Поэтому, если будет выявлено благоприятное воздействие на здоровье и / или продуктивность клубники, производители клубники смогут получать и использовать эти прививки

**Таблица 2 1:** Виды арбускулярных микоризных грибов (AMF), использованные в исследованиях (любезно предоставлено Plantworks Ltd, Кент, Великобритания)

|  |  |
| --- | --- |
| **Виды AMF** | **Представители** |
| *вида AMF*  | Funneliformis mosseae [T H Nicolson & Gerd ] C Walker & A Schüeßler 2010 |
| *Rhizophagus irregularis*  | [N C Schenck & G S Sm ] C Walker & A Schüeßler 2010 |
| *Claroideoglomus claroideum*  | [N C Schenck & G S Sm ] C Walker & A Schüeßler 2010 |
| *Воронкообразный геоспорус*  | [T H Nicolson & Gerd ] C Walker & A Schüeßler 2010 |
| *Glomus microaggregatum*  | Коске, Гемма и П Д Олексия 1986 |

~ 36 ~

**Глава 2**

**2 1 2 Биологический анализ наиболее вероятного числа**

Для определения инфекционности и оценки количества ростков в каждом образце инокулята был проведен биоанализ с наиболее вероятным числом (MPN) (Cochran, 1950; Alexander, 1982) Образцы разбавляли до 1/10, 1/100 и 1/1000, используя автоклавированный (два цикла при 121°C в течение 20 мин с 4 днями между циклами) аттапульгитовый глиняный субстрат (AgSorb®, Oil-dri Ltd, Кембриджшир, Великобритания) Для этого биоанализа*в качестве растения-ловушки использовали кукурузу (Zea mays* L ), поскольку она была описана как подходящий хозяин для *Glomus* spp (Вестберг, 1995; Бойер перс комм ); было пять повторных горшков, в каждый из которых было посажено по три семени кукурузы (рис 2 1) Затем горшки помещали либо в теплицу (температура 20-23°C, свет: темно 16 ч/8 ч, также использовались дополнительные галогенные лампы мощностью 400 Вт), либо в помещение для выращивания (днем и ночью 21-22°C, относительная влажность (RH) около 70%, свет: темно 16 ч / 8 ч, плотность потока фотосинтетических фотонов (PPFD) около 40 мкмоль м−2с−1) Растения поливали по мере необходимости водопроводной водой, а корни собирали через шесть недель после посева Собранные корни из каждого горшка затем окрашивали трипановым синим (см Раздел 2 3 1) и оценивали под микроскопом на наличие структур AMF Основываясь на частоте микроскопического присутствия структур AMF в отобранных образцах корней, затем оценивали MPN, используя таблицы MPN (Cochran, 1950)

~ 37 ~

**Глава 2**



**Рисунок 2 1:** *Zea можно*использовать в качестве растений-ловушек, выращиваемых в тепличных условиях, для оценки концентрации инокулята AMF При каждом разведении инокулята AMF использовали пять повторных горшков: 1/10, 1/100 и 1/1000

**2 2 Растительные материалы**

**2 2 1 Производство микроразмноженных растений земляники**

Чтобы быть уверенным в отсутствии ранее существовавшей микоризной колонизации, в нескольких экспериментах использовали микроразмноженные растения (далее называемые микроплантами) Микропланты *Fragaria* x *ananassa* cv ‘Calypso’ и *F*  *vesca* var *alpina* были приобретены у Hargreaves Plants Ltd, Норфолк, Великобритания, в то время как микропланты *F* x *ananassa* cv ‘Vibrant’, ‘Red glory’ и accession ‘EM-1996’, а *F* *vesca* также клон F vesca VSI были предоставлены лабораторией EMR культуры тканей NIAB, Кент, Великобритания Все микропланты выдерживали не менее двух месяцев на среде Murashige & Skoog (M&S) (Murashige & Skoog, 1962) с добавлением 0,75% агара, 3% сахарозы, 1,2 мл L-1 GA33 (фитогормон) и 8 мл L

1IBA (фитогормон) для стимуляции укоренения *In vitro* Растения In vitro инкубировали в помещении для выращивания

~ 38 ~

**Глава 2**

(21 °C, свет: темнота 16 ч / 8 ч PPFD 40 мкмоль м−2с−1) до тех пор, пока корни не разовьются достаточно для пересадки саженцев

**2 2 2 Изготовление направляющих наконечников**

Предварительно выращенные маточные растения клубники (сорта ‘Elsanta’, ‘Malling Centenary’, ‘Vibrant’, ‘Red Glory’) выращивали в мешках из кокосовой койры (Botanicoir Ltd, Лондон, Великобритания) в поли-туннельном или тепличном отделении в NIAB EMR Побеги были получены в течение трех месяцев либо в тепличных условиях (зимой; температура 20-23 ° C, свет: темнота 16 ч / 8 ч, использовалось дополнительное освещение в виде галогенных ламп мощностью 400 Вт при достаточном поливе, соответствующем режиме внесения удобрений и борьбе с вредителями), либо в условиях политоннеля (в весной и летом; естественное освещение и температура, обильный полив, соответствующие режимы внесения удобрений и борьба с вредителями) Соцветия, появляющиеся на материнских растениях, регулярно удаляли, чтобы стимулировать побеги Как только побеги побегов содержали по крайней мере три составных листа, их срезали с материнских растений и использовали для экспериментов (отъема и прививки AMF) Наконечники для побегов также были приобретены в двух коммерческих питомниках: Rw Walpole Ltd, Норфолк, Великобритания для ‘Vibrant’ и Edward Vinson Plants Ltd, Кент, Великобритания для ‘Red Glory’

**2 2 3 Питательная среда и отлучение проростков земляники от груди**

Корни микроплантатов промывали очищенной водой для удаления прилипшего агара и питательных веществ и пересаживали в отдельные ячейки лотка (40 ячеек, около 46см3на ячейку, вставка B&Q 40 ячеек 08535B, Кент, Великобритания; или 56 ячеек, 70см3на ячейку, Agrii Ltd, Кент, Великобритания) Ячейки заполняли либо неавтоклавированной кокосовой койрой (Botanicoir Ltd, Лондон, Великобритания), либо автоклавированной (два цикла при 121°C в течение 20 мин с 4 днями между циклами) вермикулитовой средой (Sinclair horticulture Ltd, Линкольн, Великобритания), удобренной 0,25 г Л-1 автоклавированной(один цикл при 121°C, 20 мин) костная мука, комплексный источник азота (N) и фосфора (P) для стимулирования AMF

~ 39 ~

**Глава 2**

развитие (3,5% N, 7,4% P; Verve, Хэмпшир, Великобритания) Затем проростки помещали в пластиковые размножители с прозрачными вентилируемыми крышками (52×42,5×24 см, Stewart Plastics Ltd, Оксон, Великобритания) и хранили в помещении для выращивания (Meridian Refrigeration Ltd, Кройдон, Великобритания; днем и ночью 21-22°C, относительная влажность около 70%, свет: темнота 16 ч/8 ч, PPFD около 40 мкмоль м−2с−1; рисунок 2 2) Оба регулируемых отверстия, имеющиеся на крышке размножителя, первоначально оставались закрытыми (1 неделя), а затем оставались открытыми (1 неделя) до полного снятия крышки Затем каждое растение поливали по мере необходимости 10 мл очищенной воды и никаких дополнительных удобрений не добавляли Загрязнение между растениями предотвращалось путем размещения ростков на пластиковом лотке модуля (т е по одной пустой ячейке лотка между каждым растением), с помощью шприца для полива каждого растения и путем исключения прямого контакта ячейки лотка модуля с нижней частью размножителя



**Рисунок 2 2:** Микропланты, отнятые от груди внутри размножителей растений, которые содержались в комнатных условиях

Свежесрезанные кончики побегов сразу же укладывали в стандартные пластиковые модульные лотки (56 ячеек, 70см3на ячейку, Agrii Ltd, Кент, Великобритания; или 48 ячеек, 70см3на ячейку, Desch Plantpak Ltd, Эссекс, Великобритания), заполненные заливочной смесью, состоящей из 7 частей ирландского темного торф (Clover Peat Products Ltd, Данганнон, Ирландия) и 3 части перлита толщиной 2,0-5,0 мм (Sinclair