

УДК 579.6+57.083.1

## ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА АДАПТАЦИЮ КЛОНИРОВАННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ДРЕВЕСНО-КУСТАРНИКОВЫХ ВИДОВ РОДА *VACCINIUM*

О.В. ЧИЖИК<sup>1</sup>, В.Н. РЕШЕТНИКОВ<sup>1</sup>, В.Л. ФИЛИПЕНЯ<sup>1</sup>, В.И. ГОРБАЦЕВИЧ<sup>1</sup>,  
Л.Е. КАРТЫЖОВА<sup>2</sup>, З.М. АЛЕЩЕНКОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»  
220012 Минск, ул. Сурганова, 2в  
e-mail: office@cbg.org.by

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»  
220141 Минск, ул. Купревича, 2  
e-mail: microbi@mbio.bas-net.by

Изучено влияние микроорганизмов на адаптацию клонированного посадочного материала древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* с целью создания комплексного микробного препарата, основу которого составляют ризобактерии и арбускулярные микоризные грибы.

**Ключевые слова:** *Vaccinium* spp., адаптация, ризобактерии, арбускулярные микоризные грибы, комплексный микробный препарат.

Результаты успешной интродукции в Белорусском Полесье голубики высокорослой, клюквы крупноплодной и брусники обыкновенной, начатой Центральным ботаническим садом НАН Беларуси в 1980 г., послужили основой для их введения в промышленную культуру. В настоящее время особенно активно развивается новое для Беларуси направление — промышленное голубиководство.

Отличительной особенностью всех представителей рода *Vaccinium* является строение их корневой системы, а именно, отсутствие корневых волосков. В естественных условиях произрастания их функцию выполняет микориза. Недосток питательных веществ в отсутствие микоризации при переносе клонированных стерильных растений в условия *ex vitro* и последующем выращивании значительно снижает их адаптивную способность, увеличивает время адаптации, замедляет рост и развитие, что в конечном итоге отрицательно сказывается на качестве посадочного материала и дальнейшей продуктивности растений. Поиск путей сокращения периода адаптации клонированных растений является чрезвычайно актуальным в технологии выращивания древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium*. Микробные препараты дают возможность направленно регулировать состав и численность микробного комплекса на корнях растений [1]. Полученные на основе высокоэффективных штаммов diaзотрофных и фосфатмобилизующих микроорганизмов биопрепараты экологичны, повышают биологический потенциал ризосферы, улучшают

питание растений, увеличивают их продуктивность, снижают себестоимость урожая [3]. Поэтому использование микроорганизмов в технологии выращивания клонированного посадочного материала перспективных сортов древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* является чрезвычайно актуальным.

Целью исследований являлась разработка комплексного микробного препарата, основу которого составляют ризобактерии и арбускулярные микоризные грибы, способные обеспечивать выживаемость клонированного посадочного материала и сокращение срока адаптации. Препарат предназначен для использования в технологии выращивания клонированного посадочного материала перспективных сортов древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium*.

### Методика

Объектами исследования служили: голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) сортов Блюкроп, Блюэтта, Нортланд, Элизабет; клюква крупноплодная (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) сортов Эртенданк, Коралл; брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) сортов Франклин, Ховес; арбускулярные микоризные грибы ризосферы голубики, брусники, клюквы; ассоциативный азотфиксирующий диазотроф 11А, выделенный из лесной почвы; фосфатмобилизующий ростстимулирующий штамм (изолят 6) и ростстимулирующий изолят 5SI.

Микробиологический состав почвы изучали методом посева на элективные питательные среды [2], интенсивность микоризации корневой системы растений (голубики, клюквы, брусники) — по [4].

Асептические культуры поддерживали пассированием на среды на основе WPM [7] с добавлением следующих компонентов: 5 мг/л 2-изопентениладенин (2иП) и 1 мг/л ИУК — для размножения голубики и брусники; 0,2 мг/л 2иП — для размножения клюквы; 1 мг/л ИМК — для укоренения голубики; 2 мг/л ИУК — для укоренения брусники; 0,5 мг/л ИМК — для укоренения клюквы.

Общую фракцию клеточных белков выделяли методом ТХУ/ацетонной преципитации по [6] с нашими дополнениями.

Количественное содержание белка в образцах определяли с помощью набора реагентов «2-D Quant Kit» (производство GE Healthcare, США). Содержание хлорофилла измеряли по методике Шлыка [5].

### Результаты и обсуждение

В ходе выполнения работы изучен микробиологический состав ризосферы ягодных культур — голубики высокорослой, клюквы крупноплодной и брусники обыкновенной — из которой выделены 38 штаммов почвенных микроорганизмов, доминирующих в микробном ценозе. Из данной группы отобраны три изолята, стимулирующих рост и развитие растений: фосфатмобилизующий изолят 6 (ФМБ), азотфиксирующий изолят 11А, изолят 5SI, обладающий ростстимулирующим действием, а также арбускулярные микоризные грибы (АМГ). Выявлено, что отобранные штаммы активно размножаются при pH 5,0—7,3, что является необходимым условием для работы с представителями рода *Vaccinium*. Подобраны оптимальные концентрации бактериальных инокулянтов.

Обработку растений голубики, клюквы и брусники разных сортов проводили через 2, 4 и 6 недель после высадки на адаптацию *ex vitro* по

следующей схеме: 1 – АМГ; 2 – АМГ + ФМБ 6; 3 – ФМБ 6; 4 – 11А; 5 – АМГ + 11А; 6 – 5SI; 7 – АМГ + 5SI.

Из семи вариантов тестируемых моно- и комплексных инокулянтов для дальнейших исследований были отобраны четыре, оказавшие наибольший видимый эффект на адаптируемые растения: варианты 1 – АМГ; 2 – АМГ + ФМБ 6; 5 – АМГ + 11А; 7 – АМГ + 5SI.

Проведены сравнительные морфолого-биологический и физиолого-биохимический анализы исследуемых растений. Выявлено стимулирующее влияние микроорганизмов на адаптируемые растения, а также видовая и сортовая специфичность действия инокулянтов.

Корневая система опытных растений голубики высокорослой характеризовалась большими объемом и разветвленностью (рис. 1), массы сы-

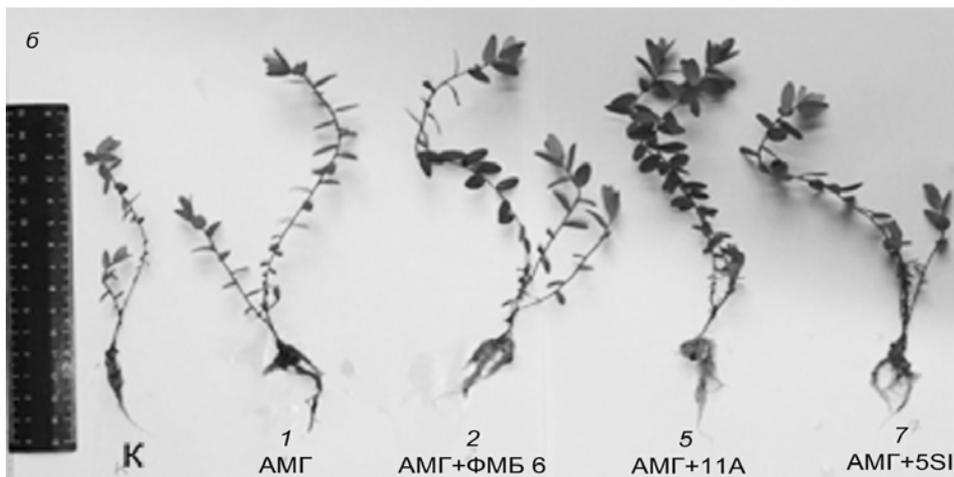


Рис. 1. Развитие надземной части и корневой системы голубики высокорослой сорта Блю-круп (а) и клюквы крупноплодной сорта Ховес (б):

К – контроль; 1 – АМГ; 2 – АМГ + ФМБ 6; 5 – АМГ + 11А; 7 – АМГ + 5SI

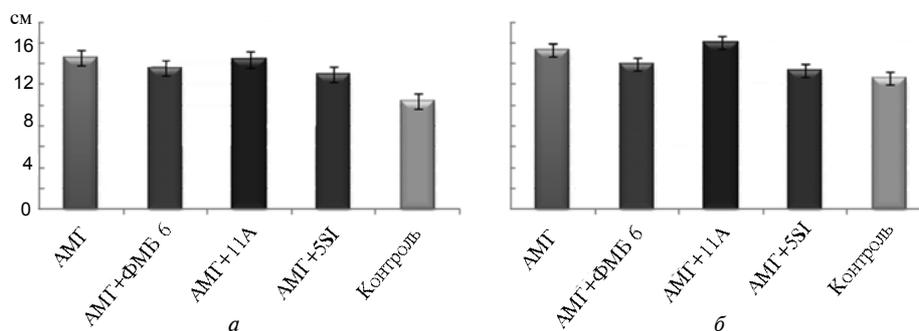


Рис. 2. Высота растений (см) кюквы крупноплодной сорта Ховес (а) и голубики высокоурожайной сорта Блюкроп (б), инокулированных микробными препаратами

рого и сухого вещества их также превосходили таковые контрольных растений (масса сухого вещества корневой системы обработанных растений превышала контрольные значения в 1,5–2 раза в зависимости от сорта).

Инокулированные растения кюквы крупноплодной превышали контрольные по высоте и массе сырого вещества надземной части и корневой системы (рис. 2). В среднем для всех сортов эти показатели увеличились в 2,5 раза. Ветвление растений по сравнению с контрольными образцами возрастало в 2–3 раза, высота — на 10–30 % в зависимости от варианта опыта (голубика), масса сырого вещества надземной части растения — от 20 до 70 %.

Установлено, что оптимальным для обработки регенерантов кюквы крупноплодной является начальный этап укоренения, обеспечивающий меньшее выпадение растений в период адаптации и улучшение их развития. Во всех вариантах опыта (инокуляция через 2, 4 и 6 недель) наблюдалась 100 %-я приживаемость.

Фотосинтез находится в прямой зависимости от содержания пигментов в листьях растений. В табл. 1 представлены данные по содержанию зеленых пигментов в листьях кюквы крупноплодной. Полученные результаты показали, что обработка отобранными инокулятами оказывала положительное стимулирующее влияние на физиологическое состояние адаптантов.

ТАБЛИЦА 1. Содержание пигментов в листьях кюквы крупноплодной сорта Ховес (мкг/г сырого вещества)

Вариант	Хлорофилл		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
Контроль	438,0±0,9	345,0±0,8	783,0±0,8
AMГ	432,9±0,8	414,4±0,9	847,3±1,0
AMГ + 11A/2	423,0±1,1	527,5±1,2	950,5±1,2
AMГ + ФМБ 6	424,0±1,0	521,5±1,0	945,5±1,1
AMГ + 5SI	486,3±0,9	426,6±1,2	912,9±0,9

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 различия между контролем и опытом достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Содержание хлорофилла *b* в листьях опытных вариантов превышало контрольные значения (АМГ + 11А — на 52 %, АМГ + ФМБ 6 — на 51, АМГ + 5SI — на 23,6 %). Наибольший эффект мы наблюдали при обработке растений клюквы АМГ + 11А. Сумма хлорофиллов *a* + *b* превышала таковую в контроле на 16,5–21 %.

Интенсивность микоризации инокулированных растений микоризой превышала контрольную величину на 60 % вследствие формирования, помимо мицелия, структур питания (арбускулы). Установлено, что в варианте с АМГ и ассоциативным diaзотрофом интенсифицируется процесс формирования структур размножения. Помимо мицелия и арбускул образуются везикулы, что свидетельствует о более интенсивном размножении АМГ, чем в моноварианте (только АМГ).

Совместное применение АМГ и ассоциативного diaзотрофа обеспечивало более мощное развитие корневой системы — в 24 раза превышало контрольные показатели. Обработка корней АМГ + 11А в период адаптации давала 100 %-й выход хорошо развитых саженцев клюквы.

Обработка брусники обыкновенной отобранными инокулянтами также дала положительный эффект. Наибольшее положительное влияние на растения отмечено при применении комплексных микробных препаратов АМГ + 11А и АМГ + 5SI.

Адаптация растений к стрессам контролируется сложной молекулярно-генетической системой. Обычно при стрессе, вызванном переносом растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* (переход на автотрофный тип питания, физиологические перестройки), содержание белка в растениях изменяется.

В варианте с применением фосфатмобилизующей ассоциации АМГ + ФМБ 6 на первых стадиях онтогенеза в листьях интенсивно накапливаются легкорастворимые белки, содержание которых в среднем по сортам превышало контрольное на 43,5 % (табл. 2). При использовании другой ассоциации микроорганизмов — АМГ + 11А — наблюдалось некоторое снижение накопления легкорастворимых белков. Статистически данное снижение по сравнению с контролем незначимо и находится в пределах погрешности опыта.

Таким образом, выполненные исследования показали, что обработка растений комплексными микробными препаратами обеспечивает снижение стрессовой нагрузки на растения в период адаптации, что положительно сказывается на процессах роста, интенсивности укоренения, выходе стандартных саженцев (около 100 %).

Работа ведется в рамках ГНТП «Новые биотехнологии и биопрепараты для сельского хозяйства, промышленности, здравоохранения и защиты окружающей среды» («Промышленные биотехнологии»), 2011–2015 гг.

ТАБЛИЦА 2. Содержание легкорастворимых белков в листьях голубики высокорослой

Вариант	Сорт Блюкроп	Сорт Элизабет
	Содержание белков, мг/мг сырого вещества	
Контроль	0,217±0,10	0,154±0,15
АМГ + 11А	0,209±0,11	0,208±0,13
АМГ + ФМБ 6	0,330±0,21	0,135±0,30

1. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай. — М.: ВНИИА, 2005. — 302 с.
2. Лабутова Н.М. Методы исследования арбускулярных микоризных грибов. — СПб.: Изд-во ВНИИ с.-х. микробиологии, 2000. — 24 с.
3. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 3. — С. 187—207.
4. Попова Ж.П. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почв. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 46 с.
5. Шлык А.А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Биохимия. — 1968. — 33, вып. 2. — С. 275—285.
6. Amte S. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes // Proteomics. — 2005. — 5. — P. 2508—2518.
7. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. — 1980. — 30. — P. 421—427.

Получено 16.10.2012

ВПЛИВ МІКРООРГАНІЗМІВ НА АДАПТАЦІЮ КЛОНОВАНОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ДЕРЕВНО-ЧАГАРНИКОВИХ ВИДІВ РОДУ *VACCINIUM*

О.В. Чижик<sup>1</sup>, В.М. Решетников<sup>1</sup>, В.Л. Філіпеня<sup>1</sup>, В.Й. Горбачевич<sup>1</sup>, Л.Є. Картижова<sup>2</sup>,  
З.М. Алещенкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Державний науковий заклад «Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі», Мінськ

<sup>2</sup>Державний науковий заклад «Інститут мікробіології Національної академії наук Білорусі», Мінськ

Вивчено вплив мікроорганізмів на адаптацію клонованого посадкового матеріалу деревно-чагарникових видів роду *Vaccinium* з метою створення комплексного мікробного препарату, основою якого є ризобактерії та арбускулярні микоризні гриби.

THE MICROORGANISMS INFLUENCE ON ADAPTATION OF CLONAL PLANTING STOCK OF HARDY-SHRUB SPECIES OF *VACCINIUM*

O.V. Chizhik<sup>1</sup>, V.N. Reshetnikov<sup>1</sup>, V.L. Filipenya<sup>1</sup>, V.I. Gorbatzevich<sup>1</sup>, L.E. Kartyzhova<sup>2</sup>,  
Z.M. Aleschenkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Scientific Institution «The Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus»

2-v Surganov St., Minsk, BY-220012, Republic of Belarus

<sup>2</sup>State Scientific Institution «The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus»

2 Academician V.F. Kuprevich St., Minsk, BY-220141, Republic of Belarus

The microorganisms influence on clonal planting stock of hardy-shrub species of *Vaccinium* growing during adaptation and postadaptation period was studied. As a result the complex microbial preparation with rhizobacteria and mycorrhizal fungi was created.

*Key words:* *Vaccinium* spp., adaptation, rhizobacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, the complex microbial preparation.