

УДК 60:364.737:581.557.24

Я.С. КАМЕЛЬЧУК

аспирант кафедры биотехнологии,
Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

А.А. ВОЛОТОВИЧ, канд. биол. наук

Республиканский лесной селекционно–семеноводческий центр,
г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 21 марта 2018г.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ, ИНОКУЛИРОВАННЫХ МИКОРИЗООБРАЗУЮЩИМИ ГРИБАМИ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

При размножении in vitro этап акклиматизации считается критическим и происходит массовая гибель растений, в связи с чем применение микоризных грибов при микроклональном размножении поможет повысить выживаемость растений в условиях ex vitro и является перспективным методом при адаптации растений. В статье представлены исследования по изучению видового состава микоризных грибов у голубики высокорослой и черники обыкновенной и применение их на этапе адаптации растений.

Ключевые слова: микроклональное размножение, микориза, микоризообразующие грибы, инокуляция, ex vitro, адаптация

Введение. Одно из направлений в биотехнологии связано с расширением исследований микоризных грибов, оказывающих стимулирующее действие на рост и развитие растений. Интерес к указанным грибам вызван тем, что растения *in vitro* демонстрируют ярко выраженный положительный ростовой ответ на колонизацию корней грибным мицелием. Улучшение роста растений сопровождается повышением устойчивости к стрессовым ситуациям и патогенам. Эти эффекты обусловлены активностью грибного мицелия, который поглощает минеральные элементы, особенно малоподвижные (P, Cu, Zn), и переносит их в корни ассоциированного растения–хозяина, получая взамен органические формы углерода. Грибы микоризообразователи способствуют улучшению усвоения фосфорсодержащих соединений растениями, как правило, в зоне корнеобитаемого слоя почвы в условиях роста *in vivo*, оказывает влияние и химический состав почвы на распространённость и интенсивность микоризы. Подавляющее количество фосфора фиксируется почвой, превращаясь в труднодоступные для растений фосфаты. Валовые запасы фосфора в почвах довольно значительны, однако фосфор находится в них в нерастворимой, малодоступной для растений форме. Это объясняется тем, что дефицит фосфора в кислых почвах часто связан с токсичностью алюминия и марганца, особенно, если $pH < 5,4$. Ионы алюминия и железа, преобладающие в кислых почвах, взаимодействуют с фосфором, вследствие чего он становится недоступным для растений. Новый этап изучения микробиологической фосфатмобилизации наступил с установлением важной роли микоризных грибов в снабжении растений почвенным фосфором. Арбускулярные грибы эффективны и необходимы растению в определенном диапазоне содержания фосфора. Низкое содержание этого элемента стимулирует развитие микоризы, приносящей выгоду растениям, и наоборот [8, 11, 18, 19].

Для представителей семейства *Ericaceae* характерно формирование эрикоидной и арбутоидной микоризы, которые свойственны сравнительно небольшому числу видов – 1,8% изученных микоризных растений [5].

В условиях промышленной эксплуатации бывшего торфяного месторождения при создании ягодных плантаций голубики высокорослой на территории Белорусского Полесья инфицирование растений выглядит проблематичным, т.к. при добыче торфа сняты верхние слои, для которых свойственно высокое разнообразие микроорганизмов, в том числе и спор микоризообразующих грибов [3]. Привнос микрофлоры возможен аэрогенным путем или при посадке растений вместе с

грунтом (при использовании контейнеров с закрытой корневой системой). Наличие видов, способных инфицировать ягодные растения, особенно интродуцированные виды, в этих условиях представляется маловероятным. Микроклональное размножение растений *in vitro* предполагает полную стерилизацию и размножение стерильных регенерантов. На этапе адаптации укорененных регенерантов к условиям роста *ex vitro* необходимо возвращать микоризообразователи путем инокуляции, используя в дальнейшем микоризные подкормки на этапе формирования зрелого растения.

В связи с вышеизложенным перспективно направление по разработке и подбору эффективных индукторов микоризообразования при возделывании голубики высокорослой. Оно рассматривается как важнейшая область биотехнологии, в которой решается целенаправленная задача по регулированию процесса микоризообразования в растениях, что в конечном итоге способствует повышению их продуктивности и устойчивости.

Целью настоящего исследования является выявление видового (родового) состава микоризных грибов аборигенных растений черники и культурного сорта голубики, установление влияния искусственной микоризации выделенными грибами на этапе адаптации голубики высокорослой к условиям *ex vitro*.

Методика и объекты исследования. Исследования проводились в 2015–2016 г. на базе лаборатории прикладной фундаментальной биотехнологии, микробиологии ПолесГУ, а также научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве.

Объектами исследования являлись корни представителей семейства вересковых растений аборигенного вида – черники обыкновенной, культурного вида – голубики высокорослой сортов Reka, Denisa blue; микоризные грибы голубики, черники. Материалом для проведения исследований явились: корневые волоски черники обыкновенной; корневые волоски голубики высокорослой; ризосфера и ризоплана вышеназванных растений; растения-регенеранты голубики высокорослой сортов Reka, Denisa blue, выращенные в условиях *in vitro*.

Отбор образцов корней черники для исследования производили в естественных фитоценозах три раза в год – вначале периода вегетации; в период созревания семян; в конце периода вегетации. Корни голубики отбирали с экспериментально-опытного участка биотехнологического факультета ПолесГУ. При этом отбор образцов 20 растений каждого вида проводили по методике [4]. Важным условием получения достоверных результатов видового состава микоризообразующих грибов, является минимизация времени от момента изъятия корней из почвы до их анализа. Нами экспериментальная часть работы с образцами производилась в течение 24 часов после сбора.

После удаления с корней почвы при помощи пинцета и кисточки, их помещали в колбу со 100 мл стерильной воды. Колбу встряхивали на качалке в течение 10 мин., затем с помощью стерильного пинцета переносили в следующую колбу со стерильной водой и повторно встряхивали на качалке. Проводили 5–7 смывов с корней. Посев осуществляли на сусло-агар, среду Чапека, картофельно-глюкозный агар.

Для выявления видов эндофитных грибов, развивающихся во внутренних слоях корня, проводили многостадийную поверхностную стерилизацию отмытых от почвы корней различными веществами в следующей последовательности: мыльным раствором; дистиллированной водой; бытовым отбеливателем: погружали исследуемые объекты в бытовой отбеливатель (действующее вещество 2%-ный раствор гипохлорита натрия) с выдержкой в 5 и 10 минут; дистиллированной водой (4–5 раз, для удаления остатков отбеливателя); 70% спиртом: образцы погружали в 70% спирт (выдержка не более 3–4 сек); дистиллированной водой [7].

Для исследования состава микоризообразующих грибов отрезки корня измельчали стерильным лезвием на кусочки длиной 1–2 мм и раскладывали на различные питательные среды под ламинар-боксом по методике [4]. Всего было разложено 800 фрагментов корней. Культивирование проводили при +23°C в течение 15 суток, начиная со 2-ых суток периодически просматривали, отмечали рост, под световым микроскопом отслеживали спороношение и выделяли микромицеты в чистые культуры на отдельные чашки Петри со средой, на которых данный микромицет дал первоначальный рост. Для предотвращения развития бактерий вносили пенициллин в количестве 100 мг/л.

Микробиологический анализ поверхности корней (ризопланы) проводили по методике Гузевой и Звягинцева [4]. Десорбцию микромицетов с почвенных частиц проводили на качалке в течение 10–15 мин. Для посева микроорганизмов готовили разведения полученной суспензии (1:100;

1:1000; 1:10 000). Из каждой пробирки 1 мл суспензии высевали в стерильные чашки Петри. Посев из каждой пробирки производили в 1–2 чашки (над пламенем горелки, под ламинар–боксом) на расплавленную, охлажденную до +40°C агаризованную питательную среду Чапека. Чашки Петри с посевами помещали в термостат для инкубации при температуре +25°C на 10 суток. Для выделения микроорганизмов, развивающихся на поверхности корней и тонком слое прилегающих к ней почвенных частиц, а также во внутренних тканях корня, использовали методику [9].

Для определения сопутствующей микоризе микробиоты (почвенных бактерий) чашки Петри с посевами помещали в термостат при температуре +25° С на 10 суток. Затем производили микро-скопирование и физиолого–биохимические тесты с целью определения родов почвенных бактерий. Определение производили при помощи определителя бактерий Берджи [12].

За культурой грибов наблюдали в течение нескольких недель с интервалом 2–3 дня. При описании культуральных признаков грибов отмечали скорость роста колоний, внешний вид и текстуру колонии, окраску колонии, субстратного и воздушного мицелия, диффузию пигмента в агар, окраску окружающей питательной среды. Отмечали складчатость колонии [9]. Для характеристики морфологических признаков, культуру грибов сначала просматривали на чашках Петри при малом увеличении микроскопа, а затем готовили микроскопический препарат методом «раздавленной» капли [6, 10]. Для коллекционных культур микоризных грибов использовали метод хранения под вазелиновым маслом в холодильнике [9].

Для приготовления грибного инокулюма, отобранные чашки Петри с образцами штаммов для инокуляции вскрывали под ламинаром. Из краевой зоны колонии, развившейся на агаризованной среде, с помощью стерильного скальпеля вырезали пробки размером 5x5 мм культуры гриба–микоризообразователя, и вносили эти пробки в количестве 4 штуки в плоскодонную колбу на 500 мл с жидкой средой Чапека, заполненной на 1/3 колбы. Культивирование спор грибов проводили на орбитальном шейкере при 70 оборотах, в темном месте, при температуре +20°C до размера шариков из спор 5–15 мм. Далее выращенные споры подвергали растиранию в ступе с 50 мл жидкой среды Чапека с целью их разбиения. Просматривали под микроскопом на наличие конидий и спор. Полученную суспензию разводили в 500 мл дистиллированной воды и использовали для замачивания регенерантов на сутки [15].

Для изучения выделенных микоризообразующих грибов на рост и развитие растений голубики высокорослой в условиях *ex vitro*, были отобраны 8 грибов, а также их смеси: 7–8 гриба, всех грибов с 1 по 8 и взяты для эксперимента 2 сорта голубики – Reka и Denisa blue. Растения, укорененные *in vitro*, отмывали от остатков питательной среды, вымачивали в приготовленном инокулюме из отобранных штаммов грибов, высаживали в кассеты, заполненные на 1/3 торфяным субстратом. Кассеты с адаптантами накрывали полиэтиленовой пленкой, создавая условия повышенной влажности, до тех пор, пока не появлялись новые молодые листочки. Растения ежедневно опрыскивали водопроводной водой. Освещение 3000 лк, температура +23°C, фотопериод – 16/8 ч. Условно отобранным видам грибов присвоили номера: № 1 – *Mortirella sp.*, № 2 – *Alternaria alternata*, № 3 – *Pachybasium hamatum*, № 4 – *Spicaria elegans*, № 5 – *Coremiopsis rosea*, № 6 – *Rhinocephalum*, № 7 – *Rhizophagus irregularis*, № 8 – *Oidiodendron*, № 7 и № 8 – *Rhizophagus irregularis* и *Oidiodendron*, смеси всех грибов № 1 – 8 – *Mortirella sp.*, *Alternaria alternate*, *Pachybasium hamatum*, *Spicaria elegans*, *Coremiopsis rosea*, *Rhinocephalum*, *Rhizophagus irregularis*, *Oidiodendron*.

Результаты и их обсуждение. После идентификации выросших в чистых культурах грибов приготовили микропрепараты из этих грибов, которые просматривали под микроскопом. Для последующего анализа по определителям, атласам микроскопических грибов [6,10,13,14,17] были использованы данные микроскопии препаратов из грибов. Определены эндофитные грибы, выделенные из семейства вересковых и присущие только голубике: *Sporotrichum aureum*, *Penicillium glabrum*, *Pithomyces sp.*, *Cylindrocarpon sp.*, *Coremiopsis rosea*, *Monilia humicola*, *Rhizophagus irregularis*, *Mortierella sp.*, *Oidiodendron*, только чернике – *Cylindrocladium sporarium*, *Pachybasium hamatum*, *Rhinocephalum*, *Phialophora cinerescens*, *Spicaria elegans*, *Fusarium sp.*, а также определены общие виды – *Penicillium expansum*, *Penicillium sp.*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium janthinellum*, *Alternaria alternata*. Наиболее часто встречаемые виды у голубики – *Alternaria alternata*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium expansum*, редкий вид – *Rhizophagus irregularis*, а самым редким оказался род *Oidiodendron*. Для черники часто встречаемыми видами оказались *Penicillium sp.*, *Alternaria alternata*, *Penicillium janthinellum*, редким оказался род *Phialophora cinerescens*.

При выделении микроорганизмов из ризосферы и ризопланы растений были обнаружены сле-

дующие сопутствующие микоризе вересковых бактерии родов *Desulfitobacterium*, *Escherichia coli*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Azotobacter* и дрожжи рода *Hanseniaspora*. По обнаруженным бактериям сделано заключение, что они участвуют в поглощении растением питательных веществ, стимуляции роста и защите растений от патогенов, а также фиксации азота.

Схема опыта по влиянию искусственной микоризации выделенными грибами микроклонов голубики высокой при адаптации к условиям *ex vitro* включала 11 вариантов в трех повторностях: 1 – контроль, 2 – использование штамма гриба № 1 микоризы, 3 – использование штамма гриба № 2 микоризы, 4 – использование штамма гриба № 3 микоризы, 5 – использование штамма гриба № 4 микоризы, 6 – использование штамма гриба № 5 микоризы, 7 – использование штамма гриба № 6 микоризы, 8 – использование штамма гриба № 7 микоризы, 9 – использование штамма гриба № 8 микоризы, 10 – использование смеси штамма грибов № 7 и № 8 микоризы, 11 – использование смеси штамма всех грибов (№ 1 – 8) микоризы.

Эксперимент длился 5 месяцев. В конце эксперимента проводили замеры опытных и контрольных растений по высоте, количеству листьев, длине и ширине листа, длине корней, а также определяли прирост биомассы и жизнеспособность растений. Общий математический анализ и дисперсионный анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [1], с использованием программы статистического анализа данных AB-Stat v.1.0 [2].

Результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у растений сортов Denisa blue и Reka приведены в таблицах 1 и 2 соответственно. Общий анализ изменчивости признаков указывает на то, что у сортов Denisa blue и Reka по всем анализируемым признакам, кроме количества листьев и жизнеспособности, наблюдалось достоверное превышение показателей по вариантам опыта над контрольными значениями (таблица 1).

Анализ высоты растений сортов Denisa blue и Reka указывает на то, что характер изменчивости признака определяется присутствием в грунте одного вида штамма или их смеси. При замачивании регенерантов сорта Denisa blue в инокулюме штамма 1 высота растений достоверно увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контролем, штамма 2 – в 1,7 раза, штамма 3 – 1,5 раза, штамма 4 – 1,6 раза, штамма 5 – 1,2 раза, штамма 6 – 1,7 раза, штамма 7 – 1,6 раза, штамма 8 – в 1,5 раза, смеси штаммов 7 и 8 – в 1,8 раза, смеси всех штаммов 1–8 – в 2 раза. Следует отметить, что наиболее высокие показатели высоты растений сорта Denisa blue получены при сочетании всех штаммов (таблица 1).

Анализ высоты растений при замачивании регенерантов сорта Reka в инокулюме штамма 1, высота растений достоверно увеличилась в 2 раза по сравнению с контролем, штамма 2 – в 1,9 раза, штамма 3 – 1,8 раза, штамма 4 – 1,8 раза, штамма 5 – 1,6 раза, штамма 6 – 1,8 раза, штамма 7 – 1,8 раза, штамма 8 – в 1,8 раза, смеси штаммов 7 и 8 – в 2,2 раза, смеси всех штаммов 1–8 – в 2,8 раза. Следует отметить, что наиболее высокое достоверное превышение высоты растений сорта Reka над показателями в контроле получено при сочетании всех штаммов (таблица 1).

По количеству листьев у растений сорта Denisa blue характер изменчивости признака при наличии штаммов 1,2,3,4,5,7,8, смеси штаммов 7–8 имеет несущественное превышение над контрольным показателем. В присутствии штамма 6 характер изменчивости признака достоверно увеличился в 1,2 раза, а при наличии смеси всех штаммов – достоверно увеличился в 1,2 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

У растений сорта Reka в присутствии штаммов 1,3,5,6,7 наблюдали незначительное снижение количества листьев по сравнению с контролем. В присутствии штамма 2, 8 и смеси всех штаммов установлено достоверное увеличение признака в 1,3 и в 1,2 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

Анализ длины листьев у сорта Denisa blue указывает на то, что характер изменчивости признака в присутствии штаммов 1, 3 достоверно увеличился в 1,8 раза, штамма 2 – в 1,9 раза, штамма 4,8 – в 1,7 раза, штамма 5 – в 1,5 раза, штамма 6 – в 2 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что наиболее высокие показатели длины листьев получены при сочетании всех штаммов и смеси 7–8 штаммов (таблица 1).

Анализ длины листьев у сорта Reka показывает, что в присутствии штаммов 1, 2 она достоверно увеличилась в 1,5 раза по сравнению с контролем, штамма 3 – в 1,3 раза, штамма 4 – в 1,6 раза, штамма 5 – в 1,4 раза, штамма 6, 7 – в 1,7 раза, штамма 8 – в 1,4 раза, смеси штаммов 7–8 – в 1,8 раза, смеси штаммов 1–8 – в 2,2 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что наиболее высокие показатели длины листьев получены при сочетании всех штаммов (таблица 1).

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у растений *ex vitro* сортовой голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L. в присутствии грибов микоризообразователей

Сорт	Штамм	ВР, мм	КЛ, шт.	ДЛ, мм	ШЛ, мм	ПБ, г	ДК, мм	ЖР, %
Denisa blue	Контроль	70,4±2,2	11,7±0,6	11,3±0,5	6,3±0,3	0,0406±0,0046	27,2±2,5	81,3±2,9
	1	105,3±3,9**	12,7±0,6	19,9±0,7**	11,5±0,6**	0,1511±0,0206	34,3±1,6	82,3±2,9
	2	120,8±4,4**	13,0±0,7	21,3±1,2**	11,2±0,6**	0,2391±0,0278**	45,0±2,9**	81,0±1,0
	3	105,8±8,8**	11,9±0,9	19,6±1,8**	10,7±0,9**	0,1733±0,0299**	37,5±4,3**	81,0±1,0
	4	110,1±3,6**	12,9±0,7	18,2±1,0**	10,5±0,6**	0,1346±0,0153	37,1±3,8**	81,3±2,9
	5	89,0±2,3**	12,5±0,6	17,3±0,9**	10,1±0,6**	0,0987±0,0069	29,3±2,2	72,0±1,0
	6	119,7±4,1**	14,4±1,5**	21,9±1,1**	12,3±0,8**	0,1942±0,0214**	37,3±2,2**	77,0±0,0
	7	111,2±3,6**	12,5±1,1	18,7±0,9**	10,0±0,5**	0,1639±0,0128**	36,1±1,6**	86,7±2,0
	8	107,6±2,9**	13,1±0,9	19,5±1,1**	10,9±0,6**	0,1477±0,0121	31,7±2,5	81,0±4,2
	Смесь 7 и 8	123,4±5,2**	12,0±0,7	24,0±1,1**	12,1±0,5**	0,2385±0,0379**	47,6±3,3**	84,3±1,3
Смесь 1–8	137,4±7,6**	14,2±0,7**	25,9±1,5**	14,4±0,8**	0,4333±0,0583**	54,9±4,1**	93,3±2,0**	
НСР _{0,05}		10,3	1,6	2,7	1,9	0,1166	8,9	5,8
НСР _{0,01}		13,6	2,1	3,6	2,5	0,1532	11,7	7,7
Reka	Контроль	67,0±3,4	10,0±0,4	21,1±0,8	13,5±0,6	0,1680±0,0243	49,0±4,1	72,3±2,9
	1	135,6±5,0**	9,3±0,7	30,7±1,4**	21,7±0,8**	0,5740±0,0472**	62,7±5,3**	76,7±2,0
	2	126,3±6,6**	12,8±1,1**	30,7±1,9**	21,3±1,2**	0,6130±0,1069**	81,7±8,2**	74,3±4,7
	3	118,3±4,8**	9,8±0,4	26,6±1,0**	17,93±0,9**	0,4522±0,0656**	67,0±4,1**	75,3±2,3
	4	122,3±4,0**	10,1±0,7	34,0±1,7**	23,27±1,0**	0,6301±0,0865**	75,7±4,8**	72,3±2,3
	5	105,1±3,6**	9,7±0,6	28,6±2,1**	19,13±1,9**	0,2426±0,0387	48,9±4,9	76,7±5,2
	6	120,4±4,1**	9,3±0,7	35,7±1,8**	25,33±1,5**	0,6551±0,6705**	86,2±5,2**	73,3±2,0
	7	121,8±7,4**	9,3±0,5	35,1±1,4**	23,53±1,3**	0,7894±0,1299**	78,1±5,3**	72,3±2,3
	8	123,7±5,4**	12,2±1,3**	28,9±1,6**	20,67±1,2**	0,5547±0,0671**	89,4±6,7**	79,7±3,3*
	Смесь 7 и 8	146,2±8,0**	10,1±0,5	38,2±1,7**	26,33±1,4**	0,9175±0,0909**	90,1±6,6**	75,3±3,9
Смесь 1–8	190,1±6,2**	11,7±0,8**	46,6±1,7**	32,00±1,2**	1,6678±0,1046**	124,2±6,0**	74,3±2,9	
НСР _{0,05}		10,3	1,6	2,7	1,9	0,1166	8,9	5,8
НСР _{0,01}		13,6	2,1	3,6	2,5	0,1532	11,7	7,7

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней. Признаки: ВР – высота растения, мм; КЛ – количество листьев, шт; ДЛ – длина листа, мм; ШЛ – ширина листа, мм; ПБ – прирост биомассы, г; ДК – длина корней, мм; ЖР – жизнеспособность растений; 1–8 – номера штаммов грибов-микоризообразователей; контроль – отсутствие штаммов грибов-микоризообразователей. НСР_{0,05} – наименьшая существенная разница при $P<0,05$; НСР_{0,01} – наименьшая существенная разница при $P<0,01$. Полужирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от значения в контроле: * - достоверно отличается от контроля при $P<0,05$; ** - при $P<0,01$. То же для таблицы 2.

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов *ex vitro* сортовой голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L. в присутствии грибов микоризообразователей

ИВ	df	ВР		КЛ		ДЛ		ШЛ		ПБ		ДК		ЖР	
		СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%
Общее	329	982,536	100	11,646	100	94,164	100	58,488	100	0,185	100	918,433	100	44,573	100
Фактор А	1	21136,000**	6,539	484,848**	12,654	13110,300**	42,319	10608,000**	55,128	18,785**	30,836	128898,400**	42,658	843,879**	29,127
Фактор В	10	15974,710**	49,418	21,825*	5,696	771,609**	24,907	330,388**	17,170	1,825**	29,962	6131,203**	20,291	42,127	14,540
АхВ	10	1781,736**	5,512	13,022	3,399	119,090**	3,844	76,336**	3,967	0,696**	11,425	1698,616**	5,621	58,879*	20,322
Повторности	14	187,434	0,812	7,711	2,817	36,535	1,651	20,081	1,461	0,101	2,325	274,185	1,270	1,682	0,116
Случайные отклонения	294	414,728	37,719	9,831	75,434	28,745	27,279	14,578	22,274	0,053	25,452	309,694	30,159	24,761	35,895

Примечание. ИВ – источник варьирования; *df* - число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – сорта голубики высокорослой (Denisa blue, Reka); фактор В – штаммы грибов-микоризообразователей (1–8, смеси 7–8 и 1–8, контроль)

Ширина листьев сорта *Denisa blue* в присутствии штамма 1, 2 достоверно увеличилась в 1,8 раза, штамма 3, 4, 8 – в 1,7 раза, штамма 5, 7 – в 1,6 раза, штамма 6 и смеси штаммов 7–8 – в 1,9 раза, смеси штаммов 1–8 достоверно увеличился в 2,3 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что наиболее высокие показатели ширины листьев получены при сочетании всех штаммов (таблица 1).

У сорта *Reka* характер изменчивости данного признака был аналогичным (таблица 1).

Во всех случаях у сорта *Denisa blue* наблюдалось достоверное превышение показателей прироста биомассы растений в присутствии любого из испытанных штаммов, а также их смесей в 2,4 – 10,7 раз по сравнению с контролем. Это для штамма 1 – в 3,7 раза, штамма 2 – в 5,9 раз, штамма 3 – в 4,2 раза, штамма 4 – в 3,3 раза, штамма 5 – в 2,4 раза, штамма 6 – в 4,8 раза, штамма 7 – в 4 раза, штамма 8 – в 3,6 раза, смеси штаммов 7–8 – в 5,9 раз, смеси всех штаммов 1–8 – в 10,7 раз (таблица 1).

У сорта *Reka* также во всех случаях наблюдалось достоверное превышение показателей прироста биомассы растений в присутствии любого из опытных штаммов, а также их смесей в 1,5 – 9,9 раз по сравнению с контролем. Для штамма 1 – в 3,4 раза, штамма 2 – в 3,6 раз, штамма 3 – в 2,7 раза, штамма 4 – в 3,6 раза, штамма 5 – в 1,4 раза, штамма 6 – в 3,9 раза, штамма 7 – в 4,7 раза, штамма 8 – в 3,3 раза, смеси штаммов 7–8 – в 5,5 раз, смеси всех штаммов 1–8 – в 9,9 раз соответственно (таблица 1).

Отмечено, что самые достоверные высокие показатели по приросту биомассы наблюдались у сорта *Denisa blue* и *Reka* при сочетании всех штаммов – в 10,7 раз и в 9,9 раз соответственно (таблица 1).

Анализ длины корней у сорта *Denisa blue* указывает на то, что характер изменчивости признака в присутствии штаммов 1, 7 достоверно увеличился в 1,3 раза, штамма 2 – в 1,6 раза, штамма 3, 4, 6 – в 1,4 раза, штамма 5 – в 1,1 раз, штамма 8 – в 1,2 раза, смеси штаммов 7–8 – в 1,8 раза, смеси штаммов 1–8 – в 2 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что наиболее высокие показатели длины корней получены при сочетании всех штаммов и смеси 7–8 штаммов (таблица 1).

Анализ длины корней у сорта *Reka* показывает, что этот показатель в присутствии штамма 1 достоверно увеличился в 1,3 раза по сравнению с контролем, штамма 2 – в 1,7 раза, штамма 3 – в 1,4 раза, штамма 4 – в 1,5 раза, штамма 6, 8 и смеси штаммов 7–8 – в 1,8 раза, штамма 7 – в 1,6 раза, смеси штаммов 1–8 – в 2,5 раза по сравнению с контролем (таблица 1).

Анализ жизнеспособности растений сорта *Denisa blue* указывает на то, что в присутствии каждого вида штамма 1,2,3,4,7,8, а также смеси 7–8 штаммов показатели были на уровне контрольных, а в присутствии штаммов 5 и 6 даже немного ниже контроля. Достоверное увеличение жизнеспособности растений в 1,2 раза по сравнению с контролем при $P < 0,01$ наблюдалось при использовании смеси всех исследуемых штаммов 1–8 (таблица 1).

Для сорта *Reka* анализ жизнеспособности растений также показывает, что показатели находились на уровне контрольных у всех штаммов и их смесей, за исключением штамма 8, применение которого при инокуляции достоверно увеличивает показатель жизнеспособности в 1,1 раза при $P < 0,05$ по сравнению с контролем (таблица 1).

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверно влияние всех факторов и их комбинаций на изменчивость всех исследуемых признаков, кроме количества листьев и жизнеспособности растений. По этим двум признакам не было выявлено достоверное влияние фактора (таблица 2).

Выводы. Впервые изучен видовой (родовой) состав микоризы растений семейства вересковых – черники обыкновенной, произрастающей в лесах Пинского района Брестской области, голубики высокорослой, интродуцированного вида, произрастающей на экспериментально–опытном участке биотехнологического факультета ПолесГУ. Наиболее встречаемыми среди обнаруженных грибов оказались представители рода *Alternaria*, обширно представлен также род *Penicillium*. Они выявлены в образцах как корневой системы черники, так и голубики. Представители рода *Sporotrichum*, вид *Sporotrichum aureum*, рода *Coremium*, вид *Coremiopsis rosea*, рода *Monilia*, вид *Monilia humicola*, рода *Rhizophagus*, вид *Rhizophagus irregularis*, рода *Mortierella*, вид *Mortierella sp.*, род *Oidiodendron* были обнаружены исключительно в образцах корневой системы голубики.

Характерным для образцов корневой системы черники является наличие грибов из рода *Cylindrocladium*, вид *Cylindrocladium sporarium*, рода *Pachybasium*, вид *Pachybasium hamatum*, а также родов *Rhinocephalum*, *Rhinocephalum*, *Spicaria*, *Fusarium*. Наряду с эндомикоризными грибами выявлены следующие сопутствующие им микроорганизмы: бактерии родов

Desulfitobacterium, Escherichia coli, Acetobacter, Bacillus, Methylobacterium, Azotobacter, дрожжи рода *Hanseniaspora*.

На основе анализа изменчивости по шести хозяйственно–ценным признакам (за исключением жизнеспособности растений) у сортов Denisa blue и Reka установлено достоверное, в большинстве случаев при $P < 0.01$, увеличение в 1,2÷10,7 раза исследуемых показателей при использовании 8 штаммов грибов, отобранных для инокуляции регенерантов сортовой голубики *ex vitro*, по сравнению с контролем. Лучшие показатели в большинстве вариантов наблюдали по морфологическим признакам: высота растений (увеличение в 1,3÷2,8 раза), прирост биомассы (увеличение в 2,7÷10,7 раза), длина корней (увеличение в 1,3÷2,5 раза). Применение искусственной микоризации выделенными эндомикоризными грибами на голубике высокой, интродуцированной в НИЛ КТР в условиях *in vitro*, повышает адаптацию растений и увеличивает в 1,1–1,2 раза жизнеспособность растений к условиям *ex vitro*. Полученные результаты имеют важное практическое значение в плане разработки способов применения выделенных штаммов микоризообразователей для подкормок растений голубики при массовом производстве посадочного материала.

Список литературы

1. Аношенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Аношенко // Генетика. – М.: Наука, 2004. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.
2. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб., 2001. – 650 с.
3. Булавко, Г.И. Развитие микоризы на корнях разных видов голубики в условиях торфяных месторождений, выведенных из эксплуатации / Г.И. Булавко, А.П. Яковлев/ Актуальные проблемы сохранения и изучения фито– и микобиоты // Минск, – 2013. – С.348–350.
4. Звягинцев, Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г. Звягинцев – М.: МГУ. 1991. – 302 с.
5. Значение консортивных связей в организации биогеоценозов: грибы, образующие везикулярно–арбускулярные эндомикоризы и методы их изучения: материалы II Всес. совещ. по проблеме изучения консорций, Пермь, 4–8 февраля 1975 г. / Л.В. Крюгер, И.А. Селиванов – Пермь: Звезда, – 1976. – 114 с.
6. Кириленко, Т.С. Атлас родов почвенных грибов (Ascomycetes и Fungi imperfecti) / Т.С. Кириленко. – Киев : Наука думка, 2007. – 128 с.
7. Коваль, Э.З. Выделение, идентификация, культивирование, хранение и селекция культур грибов — агентов коррозии кремнийсодержащих соединений/ Э.З. Коваль, Л.П. Сидоренко / Методы выделения и идентификации почвенных микромнцетов–биодеструкторов. Вильнюс, 2002. – С. 68 – 71.
8. Космачевская, Л.Н. Арбускулярно–везикулярная микориза: ее изучение и применение для повышения плодородия почв/ Л.Н. Космачевская // Агрохимия – 2013. – №2 – С. 23– 25.
9. Литвинов, М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов/ М.А. Литвинов. – Л.: Наука, 2009. – 121 с.
10. Литвинов, М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов/ М.А. Литвинов. – Л.. Наука, 2009. – 303 с.
11. Муромцев, Г.С. Почвенная микрофлора и фосфорное питание растений / Г.С. Муромцев, Г.Н. Маршунова, В.Ф. Павлова // Журн. Всесоюзного хим. общ–ва им. Д.И. Менделеева. – 1983. – Т. 28. – С. 22–27.
12. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт [и др.]; под ред. Дж. Хоулт. – М.: Мир, 1997. – 100–105 с.
13. Пидопличко, Я.М. Пенициллин (ключ для определения видов)/ Я.М. Пидопличко. – Киев : Наука думка, 2002. – 150 с.
14. Пидопличко, Я.М. Атлас мукоральных грибов/ Я.М. Пидопличко, А.А. Милько. – Киев : Наука думка, 2001. – 115 с.
15. Соколова, Н.А. Эффективность искусственной микоризации местными эндомикоризными грибами на обыкновенном черноземе / Н.А. Соколова // Тез. Всесоюз. школы–конф. молодых ученых. Экологические проблемы в почвоведении и земледелии. – Курск, 2001. – С. 16–17
16. Элланская, И.А. Методы выделения и идентификации видов рода *Fusarium* Lk. ex Fr./Методы выделения и идентификации почвенных микромицетов–биодеструкторов / И.А. Эл-

ланская. – Вильнюс, 2002. – С. 125–128.

17. Agerer, R. Colour Atlas of Ectomycorrhizae / R. Agerer – Einhorn Verlag Schwabisch Gmund – 1996–2008. – V 1. – VI.

18. Miller, R.L. Survey of vesicular–arbuscular mycorrhizae in lettuce production in relation to management and soil factors / R.L. Miller/ Journal of Agricultural Science, Cambridge. – 2008. – Vol. 130. – P. 173–182.

19. Rickerl, D.H. Vesicular arbuscular endomycorrhizal colonization of wetland plants/ D.H. Rickerl / Journal of Environmental Quality. – 2013.– P. 113–116.

KAMELCHUK Yana S.
VOLOTOVICH Anton A.

ANALYSIS OF VARIABILITY OF GROWTH INDICATORS AND DEVELOPMENT OF VARIETY BLUEBERRY PLANTS HIGHLY INOCULATED BY MICROIZING FUNGULAR MUSHROOMS IN EX–VITRO CONDITIONS

At reproduction in vitro, the acclimatization stage is considered critical and mass death of plants occurs, and therefore the use of mycorrhizal fungi in microclonal reproduction will help to increase the survival of plants in ex vitro conditions and is a promising method for plant adaptation. The article presents studies on the species composition of mycorrhizal fungi in blueberry and blueberry and their application in the stage of plant adaptation.

Keywords: *microclonal reproduction, mycorrhiza, mycorrhiza-forming fungi, inoculation, ex vitro, adaptation*

References

1. Anoshenko B.Yu. Programmy analiza i optimizatsii selektsionnogo protsessa rastenii [Programs for the analysis and optimization of plant breeding]. *Genetika* [Genetika]. Moscow, 2004, vol. 30, pp. 8–9 (In Russian)

2. Borovikov V.P. *STATISTICA: Iskustvo analiza dannykh na komp'yutere* [STATISTICA: The art of analyzing data on a computer]. Saint Petersburg, 2001, 650 p. (In Russian)

3. Bulavko G.I., Yakovlev A.P. Razvitie mikorizy na kornyakh raznykh vidov golubiki v usloviyakh torfyanykh mestorozhdenii, vyvedennykh iz ekspluatatsii [The development of mycorrhizas on the roots of various species of blueberry in peat deposits, decommissioned]. *Materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Actual problems of preservation and study of phyto- and mycobiota]. Minsk, 2013, pp. 348–350 (In Russian)

4. Zvyagintsev D.G. *Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii* [Methods of soil microbiology and biochemistry]. Moscow, Moscow State University, 1991, 302 p. (In Russian)

5. Kryuger L.V., Selivanov I.A. Znachenie konsortivnykh svyazei v organizatsii biogeotsenozov: griby, obrazuyushchie vezikulyarno-arbuskulyarnye endomikorizy i metody ikh izucheniya [Importance of consortium connections in the organization of biogeocenoses: fungi, forming vesicular-arbuscular endomycorrhizas and methods for their study]. *Materialy II Vsesoyuznogo soveshchaniya po probleme izucheniya konsortsii* [Materials of the Second Union Conference on the Study of Consortium]. Permian, 1976, 114 p. (In Russian)

6. Kirilenko T.S. *Atlas rodov pochvennykh gribov (Ascomycetes i Fungi imperfecti)* [Atlas of genera of soil fungi (Ascomycetes and Fungi imperfecti)]. Kiev, Nauka dumka Publ., 2007. 128 p. (In Russian)

7. Koval' E.3., Sidorenko L.P. Vydelenie, identifikatsiya, kul'tivirovanie, khranenie i selektsiya kul'tur gribov — agentov korrozii kremniisoderzhashchikh soedinenii [Isolation, identification, cultivation, storage and selection of cultures of fungi – agents of corrosion of silicon-containing compounds]. *Materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Methods for isolating and identifying soil micromagnets-bi destructors]. Vilnius, 2002, pp. 68–71 (In Russian)

8. Kosmachevskaya L.N. Arbuskulyarno-vezikulyarnaya mikoriza: ee izuchenie i primeneniye dlya povysheniya plodorodiya pochv [Arbuscular-vesicular mycorrhiza: its study and application for increasing soil fertility]. *Agrokimiya* [Agrochemistry]. Moscow, Moscow State University 2013, no. 2,

pp. 23- 25 (In Russian)

9. Litvinov M.A. *Metody izucheniya pochvennykh mikroskopicheskikh* [Methods for studying soil microscopic fungi]. Leningrad, Nauka Publ., 2009, 121 p. (In Russian)

10. Litvinov M.A. *Opredelitel' mikroskopicheskikh pochvennykh gribov* [Determinant of microscopic soil fungi]. Leningrad, Nauka Publ., 2009, 303 p. (In Russian)

11. Muromtsev G.S., Marshunova G.N., Pavlova V.F. Pochvennaya mikroflora i fosfornoe pitanie rastenii [Soil microflora and phosphoric nutrition of plants] *Vsesoyuznoe khimicheskoe obshchestvo imeni D.I. Mendeleeva* [All-Union Chemical Society named after D.I. Mendeleev's] Moscow, 1983, vol. 28, pp. 22–27 (In Russian)

12. Khoult Dzh. *Opredelitel' bakterii Berdzhii* [The Berje`s bacteria determinant. Moscow, Mir Publ., 1997, 1430 p. (In Russian)

13. Pidoplichko Ya.M. *Penitsillin (klyuch dlya opredeleniya vidov)* [Penicillin (key for species identification)]. Kiev, Nauka dumka Publ., 2002, 150 p. (In Russian)

14. Pidoplichko Ya.M., Mil'ko A.A. Atlas mukoral'nykh gribov [Atlas of mucoral fungi]. Kiev, Nauka dumka Publ., 2001, 115 p. (In Russian)

15. Sokolova N.A. Effektivnost' iskusstvennoi mikorizatsii mestnymi endomikoriznymi gribami na obyknovennom chernozeme [Effectiveness of artificial mycorrhiza by local endomycorrhizal fungi on ordinary chernozem]. *Materialy Vsesoyuznoi shkoly-konferentsii molodykh uchenykh "Ekologicheskie problemy v pochvovedenii i zemledelii"* [Materials of the All-Union School-Conference of Young Scientists "Ecological problems in soil science and agriculture"]. Kursk, 2001, pp. 16-17 (In Russian)

16. Ellanskaya, I.A. Metody vydeleniya i identifikatsii vidov roda *Fusarium* Lk. ex Fr. [Methods for isolating and identifying species of the genus *Fusarium* Lk. ex Fr.]. *Materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Methods for isolating and identifying soil micromagnets-biodestructors]. Vilnius, 2002, pp. 125-128 (In Russian)

17. Agerer R. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn Verlag Schwabisch Gmund, 1996-2008, vol. I-VI.

18. Miller R.L. Survey of vesicular-arbuscular mycorrhizae in lettuce production in relation to management and soil factors. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 2008, vol. 130, pp. 173–182.

19. Rickerl D.H. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal colonization of wetland plants. *Journal of Environmental Quality*, 2013, pp. 113–116.

Received 21 March 2018