

УДК 631.147+631.526.3+631.527

**Редакционная коллегия:**

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

**ПРИЖИВАЕМОСТЬ МИКРОКЛОНОВ СИРЕНИ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*  
НА ПОЧВОГРУНТЕ, ИНОКУЛИРОВАННОМ *BACILLUS SUBTILIS***

М.В. Китаева, Ж.Н. Калацкая\*, Н.А. Ламан\*, Н.Г. Брель, Е.В. Спиридович, О.В. Молчан\*\*

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2В, Минск 220012, РБ

*E-mail: kitai\_m@tut.by*

\* Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, ул. Академическая, 27 Минск 220072, РБ *E-mail: kalatskayaj@mail.ru*

\*\* Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2 Минск 220141, РБ

*Ключевые слова: микроклоны Syringa L., адаптация ex vitro, бактерии Bacillus subtilis, органо-минеральные субстраты*

**Введение.** Размножение ценного посадочного материала путем микроклонирования – одна из наиболее важных отраслей современного садоводства, цветоводства и лесопитомнического хозяйства, которая использует новейшие научные достижения и разработки в области биотехнологии растений, технологий их выращивания, создания корнеобитаемых сред, систем управления микроклиматом для получения выровненного посадочного материала высокого качества.

Сирень (*Syringa L.*) – одно из наиболее популярных декоративных древесных растений, пользующееся огромным спросом при оформлении городских и сельских ландшафтов. В течение многих десятилетий сортовая сирень была представлена в достаточном объеме только в коллекциях ботанических садов. Причина отсутствия широкого ассортимента сирени в озеленении населенных пунктов в низком потенциале традиционных методов вегетативного размножения – прививкой, черенкованием, отводками.

В настоящее время альтернативным методом размножения сирени может служить микроклональное размножение. Перспективность этого метода размножения сортов сирени заключается в ускоренной их репродукции и получении оздоровленного посадочного материала.

Микроклональное размножение сирени включает в себя 3 этапа: Этап 1 – введение в культуру *in vitro* и получение асептической культуры сирени; Этап 2 – адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro*; Этап 3 – доращивание адаптированных растений в мультиплатах в условиях оранжереи [1].

Этап адаптации и перевод микрорастений в нестерильные условия является одним из сложных моментов в процессе получения посадочного материала методом культуры

*in vitro*. Это связано с тем, что в условиях *in vitro* формируется специфический культуральный фенотип, отличающийся анатомическими и физиологическими характеристиками от обычных растений. Близкая к насыщающей влажность воздуха и отсутствие градиента водного потенциала между испаряющей поверхностью листа и атмосферой, дефицит CO<sub>2</sub> в условиях культуральных сосудов приводит к ингибированию транспирации, появлению нефункционирующих устьиц и плохо развитой кутикулы, снижению осмотического давления, обезвоживания корней на агаре, нарушению водного баланса [2,3].

Одним из основных способов постепенной адаптации растений к условиям *in vivo* является поэтапная высадка микрорастений в теплицу с целью доращивания полученных микросаженцев после непосредственного укоренения и адаптации *ex vitro* асептических растений в условиях лаборатории. В качестве субстратов используют усовершенствованные стандартизированные почвогрунты, которые обеспечивают оптимальный уровень минерального питания, имеют контролируемый состав и pH, удобны в работе.

В естественных условиях растения находятся в постоянном взаимодействии с почвенной микрофлорой. Многие из микроорганизмов почвы подавляют развитие патогенов, улучшают азотное и фосфорное питание растений. Поскольку микроклоны *in vitro* находятся в стерильных условиях и не вступают во взаимодействие с микроорганизмами, целесообразно насыщать субстраты специально отобранными штаммами бактерий, которые выделяют в корнеобитаемую среду биологически-активные вещества, стимулируя рост и устойчивость растений, и проявляют антагонистическую активность к патогенам.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния микроорганизмов *Bacillus subtilis*, используемых при разработке почвогрунтов на основе природных высокодисперсных материалов и верхового торфа, на приживаемость микроклонов сирени в условиях *ex vitro* и получение стандартного посадочного материала.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись растения-регенеранты рода сирени (*Syringa* L.) из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси сортов: «Маленький Принц», «Лунный Свет», «Бюффон», «Кондорсе», «Китайская».

Исследуемые микроклоны сирени в условиях *in vitro* произрастали на питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей половинный набор макросолей и витаминов В1, В6, РР, глицин, мезоинозит, хелат железа, сахарозу (30 г/л), а в качестве желирующих компонентов использовали бактериологический агар. Для активации пазушных меристем в родительской ткани использовали следующие регуляторы роста – цитокинины: 6-бензиаминопурин (6-БАП) в концентрациях от 1 до 5 мг/л.

После определенного периода культивирования в асептических условиях на средах для размножения с целью получения достаточного количества материала следовал этап укоренения и адаптации сирени *ex vitro*. Субстратом для посадки был выбран агроперлит. Субстрат пропитывали 0,1-0,2 % раствором бета-индолилмасляной кислотой (ИМК). Адаптацию проводили на освещенных стеллажах при 16/8 фотопериоде и температуре 20-25°C.

Спустя 1,5-2 месяца укоренения и адаптации были получены саженцы готовые к пикированию в условиях оранжереи в микроплаты с приготовленными субстратами. В качестве субстратов использовали органо-минеральный биогрунт в двух вариантах с добавлением комплекса удобрений (N-60; P-250; K-300 мг/л субстрата и набор микроэлементов) и без удобрений, содержащие биопрепарат Биоактин (штамм М9\6 бактерий *Bacillus subtilis*, обладающий ростстимулирующими свойствами). Контролем служил органо-минеральный субстрат без включения микробиологического препарата. На первых этапах адаптации (в течение 2 недель) кассеты помещали в укрытия из спанбонда, которые позволяли поддерживать высокую влажность воздуха и оптимальную освещенность наземной части. Микросаженцы проходили этап адаптации

в течение 10 недель, приживаемость фиксировали по появлению новых листьев и по появлению точек роста (%), отмечали высохшие и погибшие растения. Опыт проведен в четырехкратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel: для каждого среднего арифметического значения (M) определяли стандартную ошибку ( $\pm m_M$ ) при уровне значимости 0,05.

**Результаты и обсуждение.** Результаты, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о положительном влиянии инокуляции микроорганизмами *Bacillus subtilis* органо-минерального почвогрунта без комплекса удобрений, на приживаемость микроклонов при адаптации их к условиям *ex vitro* (таблица 1). Из данных представленных в таблице видно, что приживаемость микроклонов сирени на почвогрунтах во многом зависит от биологических особенностей сорта. Высокий потенциал к адаптации на инокулированном бактериями почвогрунте имели сорта «Лунный свет» и «Бюффон», где приживаемость микроклонов на субстрате без удобрений была на 16,6% и 7,2% соответственно выше, чем в контрольном варианте. Не отмечено значимого влияния инокуляции бактериями *B. subtilis* почвогрунта без удобрений на приживаемость микроклонов сирени сортов «Кондорсе» и «Китайская». Показано, что для сортов «Маленький принц», «Китайская» и «Кондорсе» включение в почвогрунт комплекса удобрений снижает потенциал их приживаемости. По-видимому, у данных сортов формирование корневой системы микрорастений проходит более медленными темпами и повышение концентрации солей в почвенном растворе оказывает негативное влияние на ее развитие и функционирование.

Таблица 1 — Количество адаптировавшихся растений-регенерантов сирени на органо-минеральных биогрунтах с *Bacillus subtilis*, % от исходного количества высаженных микроклонов

Сорта сирени	Лунный свет	Бюффон	Маленький принц	Китайская	Кондорсе
5 недель					
Контроль (органо-минеральный почвогрунт)	83,3±9,4	92,8±2,9	100	97,8±2,1	100
Биогрунт без удобрений	91,7±7,6	100*	88,3±10,8	100	100
Биогрунт с включением удобрений	100*	90,0±5,0	88,9±10,3	80,0±5,1*	87,5±9,4*
10 недель					
Контроль (органо-минеральный почвогрунт)	66,7±5,2	92,8±2,9	100	97,8±2,1	100
Биогрунт без удобрений	83,3±7,1*	100*	78,6±12,2*	87,5±8,4	100
Биогрунт с включением удобрений	100*	95,0±1,3	77,8±14,5*	80,0±5,1*	81,2±11,8*

Примечание - \* отмечены значения, достоверно отличающиеся от контроля

Также в ходе эксперимента проводили измерения прироста побега микрорастений сортов сирени в процессе адаптации, в повторности измеряли 20 микрорастений (таблица 2).

Таблица 2 — Длина побега микросаженцев сирени на испытываемых субстратах, см

Сорта сирени	Лунный свет	Бюффон	Маленький принц	Китайская	Кондорсе
<i>Исходная длина побега</i>					
Контроль (органо-минеральный почвогрунт)	1,5±0,28	2,5±0,31	3,2±0,33	2,4±0,26	2,3±0,19

Биогрунт без удобрений	2,7±0,18	2,9±0,31	4,2±0,98	3,3±0,43	2,1±0,17
Биогрунт с включением удобрений	2,7±0,15	4,2±0,22	3,8±0,31	3,1±0,27	2,4±0,18
<i>5 недель адаптации</i>					
Контроль (органо-минеральный почвогрунт)	1,9±0,24	2,9±0,38	3,9±0,29	3,0±0,26	3,3±0,23
Биогрунт без удобрений	2,6±0,18	3,1±0,17	4,3±0,95	3,9±0,42	2,5±0,11
Биогрунт с включением удобрений	3,0±0,17	4,8±0,25	4,0±0,29	3,3±0,28	2,4±0,21
<i>10 недель адаптации</i>					
Контроль (органо-минеральный почвогрунт)	2,2±0,25	3,1±0,37	4,4±0,25	3,6±0,27	3,3±0,19
Биогрунт без удобрений	3,2±0,17*	3,5±0,21	4,5±0,79	4,1±0,29*	2,6±0,11
Биогрунт с включением удобрений	3,1±0,19*	5,4±0,27*	4,2±0,21	3,7±0,25	3,2±0,23

Примечание - \* отмечены значения, достоверно отличающиеся от контроля

Установлено, что инокуляция микроорганизмами почвогрунта сопровождается стимуляцией роста побега микросаженцев сирени сортов «Лунный свет», «Бюффон» и «Китайская». Достоверных различий по изменению длины побега у микросаженцев сортов «Маленький принц» и «Кондорсе» в процессе адаптации на исследуемых субстратах не зарегистрировано.

**Заключение.** Органо-минеральный биогрунт, инокулированный биопрепаратом Биоактин (штамм М 9/6 микроорганизмов *Bacillus subtilis*), позволяет повысить приживаемость микрорастений сирени в условиях *ex vitro*, при этом эффективность действия зависит, в том числе, и от биологических особенностей сорта. Полученные результаты показывают также, что на этапе адаптации и перевода микрорастений в нестерильные условия для ряда генотипов сирени требуется органо-минеральный биогрунт, не содержащий удобрения или имеющий еще меньшее количество элементов питания, чем представлено в данной работе. Биогрунт в первую очередь должен характеризоваться оптимальным соотношением воздуха и воды, т.е. обеспечивать доступ кислорода к образующимся корням и поддерживать оптимальную влажность в корнеобитаемой среде. Исследования по снижению дозы удобрений и выявлению оптимальной химической природы вносимых соединений и их соотношению для адаптации микрорастений сирени проводятся.

### Литература

1. Македонская, Н.В., Брель, Н.Г. [Электронный ресурс] / Микрорастения сирени в коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси // Режим доступа : <http://botanicblog.ru/public/biotech-2008/stat41343> – Дата доступа : 20.06.2014;
2. Гигалошвили, Т.С. Условия микрорастения формируют специфический культуральный фенотип [Текст] / Т.С. Гигалошвили, О.И. Родькин, В.Г. Реуцкий // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. — М., 1997.— С.413;
3. Машкина, О.С. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии *in vitro* / О.С. Машкина, А.И. Сиволапов, Т.М. Табацкая. — Воронеж: Воронежская гос. лесотех. академия. 2011, 30с.