

О. М. Храмченкова
г. Гомель, ГГУ им. Ф. Скорины

ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР ЦИАНОБАКТЕРИЙ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Цианобактерии являются непременным компонентом микрофлоры любого типа почвы. Следовательно, прямое влияние, прежде всего, они могут оказывать на корневую систему растений, с которой контактируют в ризосфере особенно в поверхностных слоях почвы. Ризогенный эффект цианобактерий установлен при проведении лабораторных опытов со многими сельскохозяйственными культурами [1; 2; 3]. Культуры цианобактерий широко используют в качестве ростостимулирующих веществ, так как цианобактерии способны продуцировать фитогормон – индолил-3-уксусную кислоту, который синтезируется в процессе установления симбиотических отношений между цианобактерией и высшим растением [2; 3].

Среди веществ гормональной природы в выделениях цианобактерий обнаружены цитокинины и гиббереллины [3]. Для культур *Anabaena variabilis* и *Chlorogloeopsis fritschii* показан синтез ими индолил-3-уксусной кислоты и цитокининов, причем ни индолил-3-уксусная кислота, ни цитокинины не накапливались внутри клеток *A. variabilis*. Цианобактерии накапливают в почве без внесения азотных удобрений около 20–50 кг/га азота в год. Азотные удобрения резко

снижают фиксацию азота. Высокие дозы азота (100–150 кг/га) полностью подавляет азотфиксацию, и тогда цианобактерии имеют значение как накопители органического вещества [4].

В достаточной степени изучено влияние различных монокультур цианобактерий на прорастание семян и рост проростков ряда сельскохозяйственных культур. Показано, что стимулирующий эффект зависит от фазы роста культур цианобактерий и их видовой принадлежности [2; 5]. В последнее время показано, что экобиотехнологический потенциал микроорганизмов проявляется полнее всего в консорциумах. Создание искусственных консорциумов позволит обогатить среды источником углерода и азота за счет цианобактерий и является перспективным в использовании более бедных и менее ценных питательных сред [6].

Азотфиксирующие цианобактерии являются причинными агентами важнейшего процесса – азотфиксации. Эти организмы чрезвычайно устойчивы к неблагоприятным условиям, что определяет широкую амплитуду их распространения. Исследование искусственных консорциумов содержащих цианобактерии, представляют большой интерес для биотехнологии, поскольку могут удешевить культивирование и повысить эффективность инокуляционного процесса [6; 7; 8].

Культуры *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.* выделяли из почвенных образцов, отобранных на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз». Для отбора проб почв на основании данных РДЛУП «Гомельлеспроект» были выбраны участки, исключенные из сельскохозяйственного пользования и переданные под лесные культуры. Использовали последовательность методов: изоляция отдельных клеток, посеvy и пересевы на жидкие среды Дрю, ВВМ (среда Болда), ВВМ-N (среда Болда без азота) и ЧУ-10 для получения чистых культур [9]. Полученные чистые культуры *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.* были испытаны на микроклональных растениях осины в лаборатории генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса НАН Беларуси».

Для проведения исследования был использован длительно поддерживаемый клон *Populus tremula* L. V22, культивируемый на среде WPM [10; 11]. Эксплантанты культивировали при температуре 23 °С. Режим освещения – круглосуточный, 2–4 тыс. лк. После четырех недель культивирования укорененные регенеранты пересаживали в субстраты для дальнейшей адаптации к нестерильным почвенным условиям. В качестве субстрата использовали смесь следующего состава: верховой нераскисленный торф + песок + перлит в соотношении 3:1:2. Перед посадкой количество корней у каждого растения фиксировали, после чего корни обрезали до 1 см. Высота баночных растений перед посадкой была различной. Растения заглубляли на 0,2–0,3 мм. Кассеты с высаженными растениями помещали в установку с климат-контролем (поддерживаемая влажность 80–90 %). После начала формирования первого нового листа (через одну неделю) влажность постепенно снижали до естественной, световой режим меняли с 24/0 ч на 16/8 ч, 4–5 тыс. лк, $t = 21–23^{\circ}\text{C}$. Длительность первого периода адаптации составляла 4 недели с момента высадки микроклональных растений из стерильных условий. На втором этапе адаптации (дорастивании) микроклональные саженцы переставили в комнатные условия: освещенность 5–6 тыс. лк, температура 21–23 °С, фотопериод 16/8 ч, влажность 50 %. Длительность этапа – 2 недели. Непосредственно после высадки проводили однократный полив адаптируемых растений раствором культур цианобактерий. Схема опыта представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема опыта выявления влияния культур *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.* на дорастивание микроклонального посадочного материала *Populus tremula* L.

Вариант опыта	Род цианобактерий	Среда выращивания цианокультуры
Контроль	–	–
1	<i>Anabaena sp.</i>	ВВМ-N
2	<i>Anabaena sp.</i>	Дрю
3	<i>Anabaena sp.</i>	Чу-10
4	<i>Anabaena sp.</i>	ВВМ
5	<i>Nostoc sp.</i>	ВВМ-N
6	<i>Nostoc sp.</i>	Дрю
7	<i>Nostoc sp.</i>	Чу-10
8	<i>Nostoc sp.</i>	ВВМ

Развитие растений в контроле и под воздействием культур цианобактерий оценивали по показателю высоты побега (в миллиметрах от поверхности субстрата до последней развитой почки). Учитывали процент выживших растений-регенерантов в конце периода адаптации. Рассчитывали процент прироста растений и анализировали динамику развития. Учеты проводили

на 3, 21, 42 день после посадки. Установлено положительное влияние большинства использованных культур цианобактерий на рост и развитие микроклональных растений, адаптируемых к нестерильным почвенным условиям. Данные по средней высоте стволика и величине прироста представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Средняя высота стволиков и величина прироста регенерантов осины в опытах с культурами *Anabaena* sp. и *Nostoc* sp.

Вариант опыта	Средняя высота стволика, мм			Прирост		Прирост по отношению к контролю
	на 3 день	на 21 день	на 42 день	мм	%	
Контроль	35,6±9,6	42,5±11,6	58,1±13,0	22,5	63	63
1	33,1±11,4	58,5±14,0	95,2±19,3	62,1	188	167
2	33,4±10,0	53,7±17,1	86,6±24,0	53,2	159	143
3	33,2±9,0	43,0±11,2	55,4±15,8	22,2	67	56
4	30,3±8,1	47,8±11,9	69,8±20,3	39,5	130	96
5	30,6±9,6	56,2±15,8	86,9±22,9	56,3	184	144
6	30,7±8,4	50,2±15,4	77,6±19,3	46,9	153	118
7	32,2±11,6	42,6±15,1	51,6±13,7	19,4	60	45
8	33,1±12,0	43,0±10,8	50,8±15,2	15,0	42	43

Средняя высота стволика микроклональных растений осины контрольного варианта составила (58,1±13,0) мм, что существенно ниже значений аналогичного показателя в вариантах обработки саженцев культурами *Anabaena* sp. и *Nostoc* sp. Наибольшие показатели средней высоты стволика по прошествии периода выращивания в нестерильных почвенных условиях были у растений в вариантах применения культур *Anabaena* sp., полученных на средах ВВМ-N и Дрю (95,2±19,3) и (86,6±24,0) мм соответственно (достоверное отличие от контроля $F_{кр} 3,9 < F_{ст} 87,2$ и 36,7 соответственно). Для культур *Nostoc* sp., полученных на тех же средах, показатели роста микроклональных растений также были наибольшими и составили (86,9±22,9) и (77,6±19,3) мм соответственно. Отличия контроля в данном случае также достоверны $F_{кр} 3,9 < F_{ст} 41,0$ и 24,2 соответственно.

Использование культур *Anabaena* sp. и *Nostoc* sp., полученных на средах ВВМ-N и Дрю, отразилось и на интенсивности прироста микроклональных растений осины. В контроле прирост составил 22,5 мм (63 % относительно начальной высоты). Наиболее интенсивный прирост наблюдался в вариантах опыта с обработкой культурами *Anabaena* sp., полученными на средах ВВМ-N, Дрю и ВВМ, где он составил 62,1 (188 %), 53,2 (159 %) и 39,5 (130 %) соответственно. Высокая интенсивность прироста отмечена в вариантах опыта с использованием культур *Nostoc* sp., выращенных на средах ВВМ-N и Дрю: 56,3 (184 %) и 46,9 (153 %) соответственно. Для изучения процесса адаптации регенерантов к почвенным условиям анализировали динамику прироста растений.

В первые две недели опыта максимальная интенсивность прироста отмечена для растений, обработанных культурами *Anabaena* sp., полученными на средах ВВМ-N, ВВМ, Дрю и культурами *Nostoc* sp., выращенными на средах ВВМ-N и Дрю, что говорит о более быстрой акклиматизации регенерантов к нестерильным почвенным условиям в присутствии «привычных» к ним цианей. За вторые две недели данная тенденция сохранилась, что говорит о существенном влиянии культур цианобактерий на рост и развитие микроклональных саженцев осины в период адаптации.

Максимальный прирост на первом этапе адаптации отмечен в опытном варианте при обработке культурами *Nostoc* sp., выращенными на среде ВВМ-N, на втором – культурами *Anabaena* sp., полученными на среде ВВМ-N и *Nostoc* sp., выращиваемыми на среде ВВМ-N. Таким образом, среда Болда, из которой были исключены азотсодержащие соединения, оказалась наиболее пригодна для получения культур почвенных азотфиксирующих цианобактерий, применяемых для адаптации микроклональных растений к нестерильным почвенным условиям. Наименьший прирост отмечен в опытном варианте 8, где производилась обработка микроклональных растений осины культурами *Nostoc* sp., выращенными на среде ВВМ.

Для растений контрольного варианта показатель сохранности оказался высоким и составил 94 %. Максимальная сохранность регенерантов в опытных вариантах отмечена при обработке культурой *Nostoc* sp., выращенной на среде Дрю – 100 %. Наименьшая сохранность (89 %) отмечалась для растений, обработанных культурой *Nostoc* sp., выращенной на среде Чу-10.

Возможно, что единичные выпадения растений, наблюдавшиеся в первые дни после пересадки в торфо-перлитно-песчаный субстрат, связаны с физиологическим состоянием регенерантов на момент посадки, а не воздействием культур.

В конце этапа адаптации был оценен диаметр корневой шейки регенерантов. Достоверных отличий между контролем и опытными вариантами не было отмечено. Диаметр корневых шеек в контрольном варианте составил 3,3 мм, в опытных колебался от 3,5–3,8 мм.

Таким образом, установлено, что средняя высота стволиков растений осины клона V22, обработанных культурами *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.* достоверно выше данного показателя в контрольном варианте опыта. Наибольшие высоты стволика *Populus tremula* L. клона V22 по окончании адаптации к почвенным условиям были отмечены в вариантах применения культур *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.*, полученных на безазотистой среде Болда и среде Дрю. Показано, что обработка микроклональных регенерантов осины культурами *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.*, полученных на безазотистой среде Болда и среде Дрю, приводила к увеличению интенсивности роста растений. Отмечено, что показатель сохранности в конце периода адаптации был высоким, как в контрольном, так и в опытных вариантах. Культуры *Anabaena sp.* и *Nostoc sp.* показали позитивное влияние на интенсивность ростовых процессов микроклональных регенерантов осины, что позволяет рекомендовать их для практического использования в процессе адаптации микроклонов осины.

Список использованных источников

- 1 Андреев, Е. И. Цианобактерии / Е. И. Андреев, Ж. П. Коптева, В. В. Занина. – Киев : Наук, думка, 1990. – 200 с.
- 2 Lobakova, E. S. Cyanobacterialbacterial complexes in plant syncyanoses / E. S. Lobakova, G. A. Dol'nikova, T. G. Korzhenevskaya // Microbiology. – 2001. – Vol. 70, № 1. – P. 128–134.
- 3 Гольдин, Е. Б. Цианобактерии в смешанных культурах и их биоцидная активность / Е. Б. Гольдин // Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах. – Киров, 2010. – С. 84–88.
- 4 Tan, L. T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery / L. T. Tan // Phytochem. – 2007. – Vol. 68, № 7. – P. 954–979.
- 5 Chavez-Santoscoy, A. Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products / A. Chavez-Santoscoy, J. Benavides, M. Rito-Palomares, W. Vermaas // Chemical Engineering and Technology. – 2010. – Vol. 33, № 1. – P. 177–182.
- 6 Панкратова, Е. М. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kütz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий р. *Rhizobium* / Е. М. Панкратова, Л. В. Трефилова, Р. Ю. Зяблых, И. А. Устюжанин // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 2. – С. 1–7.
- 7 Трефилова, Л. В. Конструирование микробных культур на основе синезеленой водоросли *Nostoc paludosum* Kütz / Л. В. Трефилова // Альгология. – 2004. – Т. 14, № 4. – С. 445–458.
- 8 Campinas, M. Evaluation of cyanobacterial clls removal and lysis by ultrafiltration / M. Campinas, M. J. Rosa // Separation and Purification Technology. – 2010. – Vol. 70, № 3. – P. 345–353.
- 9 Гайсина, Л. А. Современные методы выделения и культивирования водорослей : учеб. пособие / Л. А. Гайсина, А. И. Фазлутдинова, Р. Р. Кабиров. – Уфа : БГПУ, 2008. – 152 с.
- 10 Smith, M. A. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species / M. A. Smith, B. H. McCown // Plant sci. lett. – 1983. – Vol. 28. – P. 149–156.
- 11 Murashige, T. A. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. A. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.