

УДК 631.53.03*579.64

А. В. Константинов, аспирант, младший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси);
М. Я. Острикова, научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)

РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕГЕНЕРАНТЫ БЕРЕЗЫ ПУШИСТОЙ И ПОВИСЛОЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

В статье описывается влияние препаратов на основе ризосферных микроорганизмов на рост и развитие растений на этапе адаптации к условиям *ex vitro*. В качестве материала использовали микроклональные растения березы пушистой, повислой и карельской разных клонов и изучали влияние 22 препаратов и штаммов. В результате выполненных экспериментов наиболее перспективные из них были отобраны для создания комплексного микробного препарата.

The paper describes the influence of soil microorganisms on growth and development of clonally propagated plants under acclimatization conditions. The microplants of white birch, silver birch and curly birch were used as material for study of the effect of 22 microbial preparations and strains. The most promising ones were selected for the design of complex microbial preparation for promotion of growth of clonally propagated planting stock.

Введение. Применение бактериальных биопрепаратов на основе ассоциативной микрофлоры – это один из экологически безопасных методов биологического земледелия [1]. Бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств (*Pseudomonas putida*, *Ps. Fluorescens*, *Bacillus subtilis* и др.), принято обозначать как PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), т. е. содействующие росту растений ризобактерии. Использование биопрепаратов на основе данной группы микроорганизмов способствует повышению почвенного плодородия и расширению видового состава ризосферных микроорганизмов [2]. Интродукция живых клеток PGPR в почву позволяет применять их в качестве средств защиты растений от фитопатогенов и стимуляторов роста [3–5].

Целью нашей работы являлось изучение влияния бактериальных штаммов и микробных препаратов на приживаемость и морфометрические параметры посадочного материала березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) и повислой (*Betula pendula* Roth.) к нестерильным почвенным условиям.

Основная часть. Работа проводилась на базе лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси.

Эффективность изучаемых микроорганизмов и оптимизацию соотношения микробных компонентов в комплексном микробном препарате проводили в модельном эксперименте. Биопрепараты испытывали с использованием генетически идентичного материала микроклональных растений на этапе адаптации к нестерильным условиям. Микроклональные культуры (6 клонов березы: бп3ф1 (береза пушистая); бб31 и бб9а1 (береза повислая); кб74, кб76 и кб2а1 (карельская форма березы повислой)) были взяты из коллекции Института леса.

Испытывались следующие штаммы почвенных ризосферных бактерий: азотфиксаторы

3/8, азотфиксаторы 3/11, *Bacillus subtilis* 9/6, *Bacillus subtilis* 7, *Bacillus subtilis* 17, *Bacillus subtilis* 14, *Bacillus subtilis* 18, *Klebsiella planticola* 5, *Rahnella aquatilis* E-10, *Pseudomonas* sp. 3, *Pseudomonas* sp. 10, *Streptococcus* sp. 35, *Enterobacter* sp. 11, П-2. Кроме того, на регенерантах берез тестировались биопрепараты: «Фрутин», «Фитопротектин», «Ризобактерин», «Биолиnum», «Гордебак», «Фитостимифос», «Бетапротектин», «Экогрин». Все исследованные штаммы и микробные препараты были предоставлены Институту микробиологии НАН Беларуси. Для обработки применялись 2%-ные рабочие растворы суточных культур микроорганизмов с оптической плотностью 0,05–0,22.

Микроклональные растения в возрасте полутора месяцев высаживали в кассеты по 54 ячейки объемом 70 мл, в качестве субстрата использовалась смесь нераскисленного верхнего торфа с песком в соотношении 3 : 1. При посадке проводилась обрезка корней растений до длины около 1 см. Под каждое растение вносили 5 мл рабочего раствора путем полива. Обработка растений контрольных вариантов не проводилась. В каждом варианте опыта было использовано от 30 до 54 регенерантов (всего более 2300 растений).

Выращивание микроклональных растений осуществлялось в условиях освещенности 4–5 тыс. люкс, температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ и фотопериоде 16/8 ч. Первые 45 сут регенеранты находились в климатической камере при уровне влажности 80–90%. После чего растения пересаживались в контейнеры большего объема и выращивались без дополнительного увлажнения воздуха.

Первоначально испытание штаммов ризосферных бактерий проводилось на растениях березы повислой клонов бб31 и кб76. Данные по средней высоте стволиков и приживаемости регенерантов березы представлены в табл. 1.

Таблица 1

Средняя высота стволиков и приживаемость регенерантов березы повислой клонов бб31 и кб76 в ходе адаптации к почвенным условиям

Вариант	Средняя высота растений, мм			Общий прирост, %	Приживаемость, %
	3-й день после посадки	4 недели после посадки	8 недель после посадки		
клон бб31					
Контроль	37,4 ± 15,1	45,0 ± 16,1	62,9 ± 15,5	69	100
«Фрутин»	41,1 ± 13,1	48,5 ± 12,6	68,8 ± 10,0	67	100
«Фитопротектин»	38,4 ± 15,2	44,4 ± 14,3	53,7 ± 14,2	40	93
<i>Bacillus subtilis</i> 9/6	40,5 ± 13,5	46,8 ± 12,3	62,4 ± 11,4	54	100
«Экогрин»	38,3 ± 12,9	44,5 ± 11,7	55,4 ± 11,0	45	100
«Бетапротектин»	36,4 ± 17,0	42,8 ± 16,4	57,3 ± 14,5	58	100
<i>Bacillus subtilis</i> 7	35,8 ± 12,2	41,1 ± 11,2	52,3 ± 12,2	46	100
<i>Klebsiella planticola</i> 5	39,5 ± 11,9	41,2 ± 14,4	52,9 ± 12,6	34	100
«П-2»	36,9 ± 12,0	46,7 ± 13,1	57,2 ± 12,2	55	100
«Азотфиксаторы 3/8»	36,2 ± 15,5	46,1 ± 13,7	61,3 ± 15,1	69	100
<i>Ps. aurantiaca</i> 3	36,8 ± 9,1	46,4 ± 12,0	61,8 ± 13,2	68	98
клон кб76					
Контроль	38,5 ± 13,2	44,7 ± 14,7	64,1 ± 17,9	66	98
<i>Bacillus subtilis</i> 17	42,6 ± 16,1	47,3 ± 16,4	68,1 ± 19,0	60	100
<i>Bacillus subtilis</i> 14	41,2 ± 12,9	51,3 ± 13,5	72,7 ± 15,3	77	100
<i>Bacillus subtilis</i> 18	38,9 ± 13,1	42,2 ± 13,5	53,7 ± 15,6	38	100
«Азотфиксаторы 3/11»	41,1 ± 16,6	44,5 ± 16,0	57,3 ± 16,5	39	100
«Экогрин»	32,0 ± 14,0	34,1 ± 13,5	48,2 ± 13,0	51	100
«П-2»	41,8 ± 16,3	45,5 ± 16,5	57,0 ± 15,3	37	100
<i>Rahnella aquatilis</i> E-10	32,6 ± 10,5	39,1 ± 10,8	57,8 ± 12,5	77	96
<i>Pseudomonas sp.</i> 10	36,9 ± 12,3	41,8 ± 11,4	58,0 ± 10,4	57	100

Анализ полученных результатов показал наличие влияния препаратов на рост растений клона бб31: средняя высота стволика в контрольном варианте – 62,9 ± 15,5 мм, в то время как в варианте с применением обработки биопрепаратом «Фрутин» – 68,8 ± 10,0 мм (наибольший показатель, статистически значимое отличие от контрольного варианта ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 4,1$ при $p < 0,05$). Средние высоты стволиков микроклональных растений, обработанных биопрепаратами «Фитопротектин» и «Экогрин», а также культурой штамма *Klebsiella planticola* 5, оказались статистически значимо ниже показателей растений контрольного варианта и составляли 53,7 ± 14,2, 55,4 ± 11,0, 52,9 ± 12,6 мм соответственно ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 7,5; 6,5; 10,2$ при $p < 0,05$). Средние высоты стволиков микроклональных растений в остальных вариантах статистически от контрольных показателей не отличались. Относительная величина прироста по вариантам изменялась пропорционально размерам саженцев (коэффициент корреляции 0,83). Во всех вариантах опыта приживаемость была на уровне 93–100%.

На карельскую березу клона 76 изучаемые штаммы и препараты оказали следующее воздействие: средняя высота растений контрольного варианта после 8 недель адаптации составляла 64,1 ± 17,9 мм. Наибольшая средняя высота адап-

тированных растений березы повислой после 8 недель выращивания отмечена на уровне 72,7 ± 15,3 мм в варианте с применением обработки культурой штамма *Bacillus subtilis* 14 (статистически значимое отличие от контрольного варианта $F_{кр} 3,9 < F_{ст} 5,3$ при $p < 0,05$). Средние высоты стволиков микроклональных растений, обработанных культурой штамма *Bacillus subtilis* 18, а также биопрепаратом «Экогрин», оказались статистически значимо ниже показателей растений контрольного варианта и составляли 53,7 ± 15,6, 57,3 ± 16,5 и 48,2 ± 13,0 мм соответственно ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 7,5; 20,4$ при $p < 0,05$). Средние высоты стволиков микроклональных растений в остальных вариантах статистически от контрольных показателей не отличались. Относительная величина прироста по вариантам изменялась пропорционально размерам саженцев (коэффициент корреляции 0,6). Во всех вариантах опыта приживаемость была на уровне 96–100%.

Отобранные штамм *Bacillus subtilis* 14 и биопрепарат «Фрутин» (на основе штамма *Bacillus subtilis* БИМ В-262) обладают фитопротекторными свойствами. Последний внедрен в сельскохозяйственное производство в качестве биопестицида для овощных культур. Однако комплексный препарат должен обладать как фитопротекторным действием на растения, так и

улучшать их минеральное питание за счет наличия штаммов с азотфиксирующими и фосфатмобилизующими свойствами для обеспечения разнопланового влияния на культивируемые растения. В связи с этим проводился отбор потенциальных компонентов микробного препарата, обладающих описанными свойствами.

В следующей серии экспериментов проводилось испытание как ранее отобранных, так и дополнительных компонентов (биопрепаратов и штаммов микроорганизмов) – «Ризобактерин», «Биолинум», «Гордебак», «Фитостимофос», *Streptococcus* sp. 35, *Enterobacter* sp. 11, *Pseudomonas* sp. 3. Исследования осуществлялись на регенерантах березы клонов бп3ф1, 74, бб9а1.

Средняя высота регенерантов в контрольном варианте с клоном бп3ф1 после 8 недель выращивания в почвенных условиях составила $60,3 \pm 23,3$ мм. Во всех опытных группах, где испытания проходили на растениях березы пушистой (бп3ф1), средняя высота стволика при обработке микробными суспензиями статистически значимо превышала данный показатель в контроле, исключение составляли варианты с использованием препарата «Фитостимофос» и *Bacillus subtilis* 14. Наибольшим названным показателем был в случае применения биопрепарата «Фрутин», штамма *Streptococcus* sp. 35 и биопрепарата «Гордебак», и они составляли $109,2 \pm 19,4$, $89,8 \pm 23,1$ и $88,3 \pm 21,6$ мм соответственно, значения достоверно отличаются от контрольных ($F_{кр} 4,0 < F_{ст} 73,8; 26,1; 26,3$ при $p < 0,05$).

Приживаемость растений березы пушистой в контрольном варианте составила 47%.

Во всех опытных группах приживаемость была выше – 49–93%. Учитывая изученные параметры, можно заключить, что наибольшее положительное влияние на развитие регенерантов клона бп3ф1 оказали препараты «Фрутин» и «Гордебак», а также штамм *Streptococcus* sp. 35.

Испытания микробных суспензий, проведенные на клонах березы повислой (кб74, бб9а1), показали, что наиболее выраженный позитивный эффект отмечался в случае обработки микрорастений биопрепаратом «Фрутин» и суспензией штамма *Bacillus subtilis* 14. Средняя высота стволика растений в названных вариантах ($71,3 \pm 20,9$ и $78,4 \pm 25,9$ мм соответственно) статистически значимо ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 8,1; 15,4$ при $p < 0,05$) превосходила аналогичный показатель в контроле. В опытных группах, в которых обработка проводилась препаратом «Гордебак», значения изучавшихся параметров не отличались от контрольного варианта. Приживаемость березы повислой была высокой во всех вариантах (83–98%).

Таким образом, наиболее выраженным ростостимулирующим эффектом на микрорастения березы обладали биопрепараты «Фрутин» и «Гордебак», а также суспензии штаммов *Streptococcus* sp. 35 и *Bacillus subtilis* 14. Наличие разработанной методики получения названных препаратов позволило отобрать их как наиболее перспективные компоненты для создания комплексного микробного препарата. Кроме того, дальнейшая работа проводилась и с другими препаратами, которые в испытаниях с микрорастениями березы демонстрировали позитивные эффекты. Так, препарат «Фитостимофос» не стимулировал рост растений, однако опытная группа, в которой он был применен, имела самую высокую приживаемость среди вариантов опыта (93%), препарат «Ризобактерин» стимулировал рост (средняя высота стволика саженцев в 1,4 раза превосходила показатель в контрольной группе).

Основываясь на результатах испытаний микробных препаратов, проведенных как в условиях чистых культур, так и при обработке микрорастений, для дальнейшего использования в качестве компонентов комплексного микробного препарата были отобраны составы «Фрутин» и «Гордебак». Результаты исследований приведены в табл. 2.

В эксперименте было изучено влияние обработки суспензиями препаратов, смешанных в следующих соотношениях: 1:1; 0,5:1 и 1:0,5. Испытание эффективности смесей было выполнено на регенератах четырех клонов березы (бп3ф1, кб2а1, бб9а1, кб74) при их адаптации к почвенным условиям.

Как следует из данных табл. 2, в большинстве случаев обработка микрорастений березы микробными суспензиями приводила к стимуляции их роста. Приживаемость микрорастений была высокой: 83–100%. Наиболее высокие показатели клона бп3ф1 были зафиксированы в случае сочетания препаратов «Фрутин» и «Гордебак» в соотношении 1 : 0,5. Среднее значение высоты стволика ($80,3 \pm 21,6$ мм) в варианте статистически значимо ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 26,9$ при $p < 0,05$) превышало показатель контрольных растений – $56,9 \pm 17,2$ мм, а приживаемость составила 98%. Обработка растений клона кб2а1 биопрепаратами «Фрутин» и «Гордебак» в соотношениях 1 : 1 и 1 : 0,5 привела к недостоверному увеличению изучаемого показателя по сравнению с контролем. Средняя высота стволиков растений клонов бб9а1 и кб74 ($61,8 \pm 22,1$ мм и $59,7 \pm 14,2$ мм), обработанных смесью микробных препаратов в соотношении 0,5 : 1, превосходила контрольные показатели ($45,0 \pm 15,6$ и $40,5 \pm 14,5$ мм) статистически значимо ($F_{кр} 3,9 < F_{ст} 12,6; 28,4$ при $p < 0,05$).

Таблица 2

**Средняя высота стволиков и приживаемость регенерантов березы
клонов бп3ф1, 74, бб9а1 в ходе адаптации к почвенным условиям**

Клон	Вариант	Средняя высота растений, мм			Прирост, %	Прижи- ваемость, %
		3-й день по- сле посадки	2 недели по- сле посадки	4 недели после посадки		
бп3ф1	Контроль	41,0 ± 15,4	44,9 ± 15,0	56,9 ± 17,2	39	93
	Фрутин : Гордебак (1 : 1)	41,3 ± 10,7	42,0 ± 14,8	60,3 ± 19,4	46	88
	Фрутин : Гордебак (1 : 0,5)	54,0 ± 19,5	58,3 ± 20,1	80,3 ± 21,6	49	98
	Фрутин : Гордебак (0,5 : 1)	48,1 ± 17,3	52,2 ± 17,0	69,9 ± 18,6	45	88
кб2а1	Контроль	34,6 ± 12,2	37,2 ± 12,8	45,3 ± 14,8	31	100
	Фрутин : Гордебак (1 : 1)	39,1 ± 13,1	40,9 ± 13,4	50,2 ± 16,0	28	100
	Фрутин : Гордебак (1 : 0,5)	29,7 ± 16,4	31,5 ± 17,1	50,6 ± 20,2	71	100
	Фрутин : Гордебак (0,5 : 1)	34,8 ± 12,2	36,3 ± 13,1	39,3 ± 13,6	13	85
бб9а1	Контроль	36,1 ± 11,6	38,1 ± 12,9	45,0 ± 15,6	25	97
	Фрутин : Гордебак (1 : 1)	42,0 ± 17,6	42,4 ± 16,9	57,8 ± 16,9	38	94
	Фрутин : Гордебак (1 : 0,5)	32,0 ± 11,7	35,1 ± 12,3	42,7 ± 16,0	34	94
	Фрутин : Гордебак (0,5 : 1)	41,7 ± 15,0	45,4 ± 16,6	61,8 ± 22,1	48	89
кб74	Контроль	34,1 ± 13,0	34,9 ± 14,2	40,5 ± 14,5	19	83
	Фрутин : Гордебак (1 : 1)	36,8 ± 12,8	38,9 ± 14,0	52,5 ± 17,9	43	100
	Фрутин : Гордебак (1 : 0,5)	37,0 ± 11,1	40,1 ± 10,8	55,3 ± 13,9	50	100
	Фрутин : Гордебак (0,5 : 1)	38,4 ± 10,7	40,8 ± 11,4	59,7 ± 14,2	55	100

Заключение. В результате проведенных исследований нами были отобраны наиболее перспективные препараты «Фрутин» и «Гордебак» на основе ризосферных бактерий для применения в ходе адаптации микроклональных растений к почвенным условиям.

Оптимальные соотношения препаратов по результатам оценки эффекта, оказываемого на микроклональные растения березы составляют 0,5 : 1 или 1 : 0,5.

Литература

1. Наплекова, Н. Н. Бак-Сиб – микробиологические препараты нового поколения / Н. Н. Наплекова, М. С. Нарсесян. – Новосибирск: ЭМ – Биотех, 2005. – 32 с.

2. Завалин, А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А. А. Завалин. – М.: Изд-во ВНИИА, 2005. – 302 с.

3. Боронин, А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А. М. Боронин // Соросовский образовательный журн. – 1998. – № 10. – С. 25–31.

4. Нечаева, Л. В. Изменение физиологических характеристик роста растений под воздействием ризосферных бактерий / Л. В. Нечаева // Известия Иркутского государственного ун-та. – 2008. – Т. 1. – № 1. – С. 68–71.

5. Лугтенберг, Б. Ризосферные псевдомонады, полезные для растений / Б. Лугтенберг, Ф. Камилова // Экологическая генетика. – 2008. – Т. VI. – № 2. – С. 4–12.

Поступила 01.03.2012