

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 60:364.737:581.557.24

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-37-41>

Поступила в редакцию 11.09.2020

Received 11.09.2020

Я. С. Камельчук¹, Н. А. Ламан²

¹Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

²Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ МИКОРИЗАЦИИ РЕГЕНЕРАНТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ НА ЭТАПЕ ИХ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO* НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОРА В РАСТЕНИЯХ

Аннотация. Проанализировано влияние микоризации регенерантов голубики высокорослой на этапе их адаптации к условиям *ex vitro* на содержание фосфора в растениях. Установлено, что у голубики сортов Блюкроп и Патриот после инокуляции микоризными грибами *Phialocephala fortinii* и *Pezizula sp.* через 2,5 мес. содержание общего фосфора значительно превышает показатели контрольных значений у обоих сортов и у растений, инокулированных обоими грибами. Показано также, что благодаря образовавшейся микоризе у адаптантов возрастает способность поглощения фосфора из почвы.

Ключевые слова: микоризные грибы, микоризация, фосфорное питание, голубика высокая, микроклональное размножение, *ex vitro*

Для цитирования: Камельчук, Я. С. Влияние микоризации регенерантов голубики высокорослой на этапе их адаптации к условиям *ex vitro* на содержание фосфора в растениях / Я. С. Камельчук, Н. А. Ламан // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 37–41. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-37-41>

Yanina S. Kamelchuk¹, Nikolai A. Laman²

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

²V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF MYCORRHIZATION OF HIGH BLUEBERRY REGENERANTS AT THE STAGE OF THEIR ADAPTATION TO *EX VITRO* CONDITIONS ON PHOSPHORUS CONTENT IN PLANTS

Abstract. The effect of mycorrhization of regenerants blueberries at the stage of adaptation to *ex vitro* conditions on the phosphorus content in plants was analyzed. It was found that in blueberry varieties Bluerop and Patriot, after inoculation with the mycorrhizas fungi *Phialocephala fortinii* and *Pezizula sp.* after 2.5 months, the content of total phosphorus in plants significantly exceeds the control values in both varieties and with both mushrooms. In adapters, due to the formed mycorrhiza, the ability to absorb phosphorus from the soil increases.

Keywords: mycorrhizas-fungi, mycorrhization, phosphorus nutrition, high blueberry, micropropagation, *ex vitro*

For citation: Kamelchuk Ya. S., Laman N. A. Influence of mycorrhization of high blueberry regenerants at the stage of their adaptation to *ex vitro* conditions on phosphorus content in plants. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 37–41 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-37-41>

Введение. Семейству Вересковые присуща микориза арбутоидная и эрикоидная [1], при этом грибной партнер вносит существенный вклад в обеспечение растения элементами минерального питания [2]. Наиболее сильно образование микоризы влияет на фосфорное питание. Фосфор необходим обоим партнерам в относительно больших количествах, поскольку входит в состав важнейших органических соединений: нуклеиновых кислот, АТФ, фосфолипидов, фосфорилированных белков и углеводов. Голубика произрастает на кислых почвах, где фосфор присутствует в форме иона ортофосфорной кислоты ($H_2PO_4^-$), который в свою очередь образует слабодоступные для растения нерастворимые соединения с находящимися в почве катионами железа, кальция или алюминия [3]. Грибы, образующие микоризу, играют важную роль в обеспечении фосфором

растений, находящихся с ними в симбиозе. Это связано со способностью клеток грибов к концентрированию ортофосфата из почв путем растворения минеральных фосфорных соединений за счет выделения в среду органических кислот [4].

В микоризированных корнях потребность растения в фосфоре может регулировать также активность переносчиков фосфора в грибе и переход этого элемента из мицелия в растение [5].

Особый интерес к микоризным грибам возникает при микроклональном размножении растений. Поскольку данный метод размножения предполагает получение только стерильных регенерантов, то на этапе их адаптации к условиям роста *ex vitro* необходимо возвращать микоризообразователи путем инокуляции или используя микоризные подкормки на этапе формирования зрелого растения.

Предполагается, что для решения такой актуальной задачи, как оптимизация фосфорного питания голубики высокорослой, необходимо увеличить доступность фосфора и повысить эффективность его использования растениями-адаптантами.

Цель данного исследования – изучение влияния микоризации регенерантов на содержание фосфора в голубике высокорослой.

Материалы и методы исследования. В эксперименте были использованы регенеранты голубики высокорослой сортов Блюкроп и Патриот научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве Полесского государственного университета. Микоризные грибы *Phialocephala fortinii* и *Pezicula sp.* были выделены из аборигенного вида черники (*Vaccinium myrtillus* L.) из естественной ценопопуляции, произрастающей в Барановичском районе.

Для микоризации готовили грибной инокулюм. Вначале отобранные чашки Петри с образцами штаммов вскрывали под ламинаром, где из краевой зоны культуры гриба-микоризообразователя, развившейся на агаризованной питательной среде, с помощью стерильного скальпеля вырезали пробки размером 5×5 мм, которые в количестве четырех штук вносили в плоскодонную колбу объемом 250 мл с питательной картофельно-глюкозной средой объемом 100 мл. Культивирование грибов проводили на шейкере при 100 об/мин при температуре +26 °С. Через 10 дней биомассу гриба путем фильтрования отделяли от культуральной жидкости, отбирали 1 г биомассы и растирали ее в ступе с небольшим количеством стерильной воды. Полученную суспензию разводили в 1000 мл дистиллированной воды и использовали в качестве инокулюма [6–8].

Для изучения влияния микоризации на содержание фосфора в растениях голубики высокорослой брали стерильные укорененные регенеранты голубики, отмывали их от остатков питательной среды, замачивали в приготовленном инокулюме и высаживали в кассеты, заполненные торфяным субстратом. Кассеты с адаптантами накрывали полиэтиленовой пленкой, создавая условия повышенной влажности до появления новых молодых листочков. Растения ежедневно опрыскивали водопроводной водой. Растения выращивали при освещенности 3000 лк, температуре +20...+23 °С, фотопериоде 16/8 ч.

Через 2,5 мес. растения изымали из грунта и определяли в них содержание общего фосфора, используя метод Дениже [9, 10]. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре, а затем по калибровочному графику находили соответствующее значение концентрации. Содержание общего фосфора (мг/100 г вещества) определяли по формуле

$$P_2O_5 = aD_x V \cdot 100 / D_{ст} V_1 n,$$

где a – концентрация раствора (образец), оптическая плотность которого близка к плотности испытуемого раствора; D_x – оптическая плотность испытуемого раствора; $D_{ст}$ – оптическая плотность эталонного раствора; V – общий объем вытяжки, мл; V_1 – объем вытяжки, взятый на определение с учетом разбавления, мл; n – навеска растительного вещества в граммах; 100 – коэффициент пересчета на 100 г вещества.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0, используя ANOVA и критерий Дункана ($p < 0,01$) для сравнения средних значений ($n = 5$). В табл. 1 данные приведены в виде среднего значения ± средняя статистическая ошибка. Построение графика проводили

в программе Microsoft Excel [11]. Для дисперсионного анализа данных и расчета доли влияния факторов на содержание общего фосфора использовали программу статистического анализа AV-Stat 1.0, разработанную в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (табл. 2) [12].

Т а б л и ц а 1. Влияние инокуляции регенерантов голубики высокорослой на содержание общего фосфора в растениях

Table 1. Effect of inoculation of regenerants blueberry high on the total phosphorus content in plants

Сорт	Штамм	P, мг/100 г	НСР _{0,05}	НСР _{0,01}
Блюкроп	Контроль	1,28 ± 0,01	0,08	0,11
	<i>Phialocephala fortinii</i>	1,95 ± 0,05**		
	<i>Pezicula sp.</i>	1,66 ± 0,01**		
Патриот	Контроль	1,36 ± 0,06		
	<i>Phialocephala fortinii</i>	2,19 ± 0,07**		
	<i>Pezicula sp.</i>	1,63 ± 0,02**		

П р и м е ч а н и е. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней. Контроль – отсутствие штаммов грибов-микорризообразователей, НСР_{0,05}, НСР_{0,01} – наименьшая существенная разница при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно. Здесь и в табл. 2 полужирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контрольных (** – достоверность отличий при $p < 0,01$).

Т а б л и ц а 2. Двухфакторный дисперсионный анализ содержания общего фосфора у адаптантов *ex vitro* голубики высокорослой, инокулированных микорризовыми грибами

Table 2. Two-way analysis of variance for total phosphorus in *ex vitro* adapters of blueberry high inoculated with mycorrhizal fungi

Показатель	df	СК	ДВ, %
Общее	29	0,110	100,000
Фактор А	1	0,066**	2,055
Фактор В	2	1,431**	89,375
А×В	2	0,050**	3,103
Повторности	4	0,005	0,657
Случайные отклонения	20	0,008	4,810

П р и м е ч а н и е. *df* – число степеней свободы, СК – средний квадрат, ДВ – доля влияния фактора (по Плохинскому), фактор А – сорта голубики высокой (Блюкроп, Патриот), фактор В – штаммы грибов-микорризообразователей (*Phialocephala fortinii*, *Pezicula sp.*, контроль).

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что через 2,5 мес. у растений, инокулированных микорризовыми грибами *Phialocephala fortinii* и *Pezicula sp.*, содержание общего фосфора достоверно превышает показатели контрольных вариантов у обоих сортов и у растений, инокулированных обоими грибами (см. табл. 1).

Благодаря симбиозу с микорризовыми грибами поглощение неорганического фосфора корневой системой было выше, чем у контрольных растений, не инокулированных микорризовыми грибами (рис. 1). Содержание общего фосфора в адаптантах голубики высокорослой достоверно увеличилось: у сорта Блюкроп с грибом *Phialocephala* – на 52 %, с грибом *Pezicula* – на 30 % по отношению к контролю; у сорта Патриот – в 1,6 и 1,2 раза соответственно.

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние всех факторов и их комбинаций на общее содержание фосфора в растениях голубики высокорослой. При этом установлено, что фактор В (штаммы грибов микорризообразователей) оказывает наибольшее влияние на содержание фосфора в адаптантах (см. табл. 2).

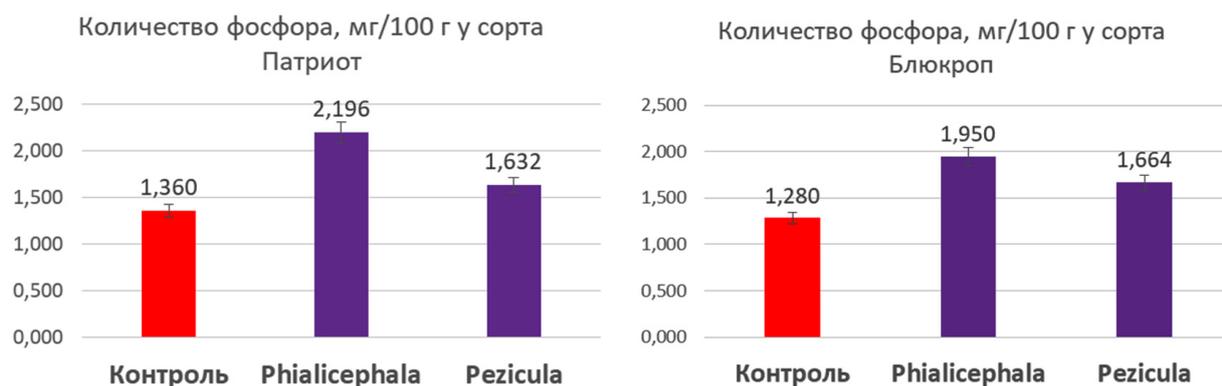


Рис. 1. Содержание общего фосфора в растениях голубики через 2,5 мес. после инокуляции

Fig. 1. The content of total phosphorus in blueberry plants 2.5 months after inoculation



Рис. 2. Адаптанты через 2,5 мес.: слева – контроль, справа – после инокуляции

Fig. 2. Adapters after 2.5 months: left control, right – after inoculation

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что в результате инокуляции у регенерантов формируется микориза, в которой накапливаются неорганические поли- и ортофосфаты. Микросклеротии микоризного гриба поглощают неорганические полифосфаты на ранней стадии взаимодействия с корнями растения, после чего для обеспечения находящегося в симбиозе с грибом растения фосфатом происходит их локальный гидролиз.

Поступающий в растения фосфор с момента посадки адаптантов усиливает рост корневой системы, вследствие чего возрастает обеспеченность растений питательными веществами, в первую очередь фосфором из почвы.

Микоризация голубики высокорослой на этапе перехода к условиям *ex vitro* значительно повышает устойчивость и минеральное питание адаптантов. Растения, инокулированные микоризными грибами, демонстрируют выраженный положительный ростовой ответ на колонизацию корней грибным мицелием и повышенное содержание фосфора, при этом поглощение фосфора усиливается в большей степени, чем других элементов питания (рис. 2).

Заключение. Согласно результатам исследования, инокуляция микромицетами *Phialocephala fortinii* и *Pezicula sp.*, представляющих собой грибы с высокой микоризообразовательной способностью, позволяет значительно улучшить доступность питательных элементов, в первую очередь фосфора, для растений голубики высокорослой. Полученные данные представляют практический интерес в плане создания на основе изученных штаммов грибов биопрепаратов для микоризации посадочного материала ягодных культур семейства Вересковые.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pearson, V. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. I. The isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture / V. Pearson, D. J. Read // *New Phytologist*. – 1973. – Vol. 72, N 2. – P. 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb02044.x>
2. Pearson, V. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. II. The transport of carbon and phosphorus by the endophyte and the mycorrhiza / V. Pearson, D. J. Read // *New Phytologist*. – 1973. – Vol. 72, N 6. – P. 1325–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb02110.x>
3. Швартау, В. В. Особенности реакций растений на дефицит фосфора / В. В. Швартау, Б. И. Гуляев, А. Б. Карлова // *Физиология и биохимия культ. растений*. – 2009. – Т. 41, № 3. — С. 208–220.
4. Plassard, C. Phosphorus nutrition of mycorrhiza / C. Plassard, B. Dell // *Tree Physiol*. – 2010. – Vol. 30, N 9. – P. 1129–1139. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq063>
5. Schachtman, D. P. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell / D. P. Schachtman, R. J. Reid, S. M. Ayling // *Plant Physiol*. – 1998. – Vol. 116, N 2. – P. 447–453. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>
6. Литвинов, М. А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов / М. А. Литвинов. – Л. : Наука, 1969. – 121 с.
7. Звягинцев, Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д. Г. Звягинцев. – М. : МГУ, 1991. – 302 с.
8. Камельчук, Я. С. Особенности выделения и культивирования *in vitro* эндомикоризных грибов из корней представителей семейства вересковых (*Ericaceae juss.*) / Я. С. Камельчук, Н. А. Ламан // *Ботаника (исследования)*. – 2018. – Вып. 47. – С. 110–115.
9. Лобанкова, О. Ю. Учебное пособие по экологической агрохимии / О. Ю. Лобанкова, А. Н. Есаулко, В. В. Агеев. – Ставрополь : Ставроп. гос. аграр. ун-т, 2014. – 173 с.
10. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Л. : Колос, 1972. – 456 с.
11. Боровиков, В. П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере / В. П. Боровиков. – СПб. : Изд. дом «Питер», 2001. – 650 с.
12. Аношенко, Б. Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б. Ю. Аношенко // *Генетика*. – 2004. – Т. 30. – С. 8–9.

References

1. Pearson V., Read D. J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. I. The isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture. *New Phytologist*, 1973, no. 2, pp. 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb02044.x>
2. Pearson V., Read D. J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. II. The transport of carbon and phosphorus by the endophyte and the mycorrhiza. *New Phytologist*, 1973, no. 6, pp. 1325–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb02110.x>
3. Shvartau V. V., Gulyaev B. I., Karlova A. B. Features of plant responses to phosphorus deficiency. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2009, vol. 41, no. 3, pp. 208–220 (in Russian).
4. Plassard C., Dell B. Phosphorus nutrition of mycorrhiza. *Tree Physiology*, 2010, vol. 30, no. 9, pp. 1129–1139. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq063>
5. Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, 1998, vol. 116, no. 2, pp. 447–453. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.447>
6. Litvinov M. A. *Methods for studying soil microscopic fungi*. Leningrad, Nauka Publ., 2009. 121 p. (in Russian).
7. Zvyagintsev D. G. *Methods of soil microbiology and biochemistry*. Moscow, Moscow State University, 1991. 302 p. (in Russian).
8. Kamel'chuk Ya. S., Laman N. A. Features of cultivation *in vitro* endomycorized mushrooms from the roots of the heather family (*Ericaceae juss.*). *Botanika (issledovaniya)* [Botany (research)], 2018, vol. 47, pp. 110–115 (in Russian).
9. Lobankova O. Yu., Esaulko A. N., Ageev V. V. *Textbook on ecological agrochemistry*. Stavropol', Stavropol', State Agrarian University, 2014. 173 p. (in Russian).
10. Ermakov A. I. (ed.). *Biochemical research methods of plants. 2nd ed.* Leningrad, Kolos Publ., 1972. 456 p. (in Russian).
11. Borovikov V. P. *STATISTICA: the art of data analysis on a computer*. Sankt-Petersburg, Publishing house "Piter", 2001. 650 p. (in Russian).
12. Anoshenko B. Yu. Analysis and optimization programs for plant breeding. *Genetika* [Genetics], 2004, vol. 30, pp. 8–9 (in Russian).

Информация об авторах

Камельчук Янина Степановна – магистр биол. наук, аспирант. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: yaninacamal@gmail.com

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Information about the authors

Yanina S. Kamelchuk – Master of biological sciences, Postgraduate student. Polesky State University (23, Dneprovskaya flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: yaninacamal@gmail.com

Nikolai A. Laman – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com