

lesostepi Zapadnoi Sibiri: metodicheskie rekomendatsii. – Novosibirsk, 1992. – 52 s.

7. Maimistov V.V. Zavisimost' mezhdru kseromorfnost'yu flagovogo lista ozimoi pshenitsy i ee urozhnost'yu pri raznoi vlagooobespechenosti // Seleksiya i semenovodstvo. – 1989. – № 3. – S. 12-15.

8. Il'ina L.G., Kuz'menko A.I., Saifullin R.G. Seleksiya yarovoi pshenitsy na zasukhoustoichivost' v Saratove // Seleksiya i semenovodstvo. – 2000. – № 2. – S. 8-12.

9. Kozlova G.Ya., Antipova G.P., Belan I.A. Izmenenie listovoi poverkhnosti yarovoi myagkoi pshenitsy v protsesse dlitel'noi seleksii v uslo-

viyakh Yuzhnoi lesostepi Zapadnoi Sibiri // Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2012. – № 4 (90). – S. 11-16.

10. Anikiev V.V., Kutuzov F.F. Novyi sposob opredeleniya ploshchadi listovoi poverkhnosti u zlakov // Fiziologiya rastenii. – 1961. – Tom 8. – Vyp. 3. – S. 20-25.

11. Orlyuk A.P., Lavrinenko Yu.A. Nasledovanie pokazatelei fotosinteticheskoi deyatel'nosti gibridami yarovoi pshenitsy v usloviyakh orosheniya // Sel'skokhozyaistvennaya biologiya. – 1982. – T. XVII. – № 3. – S. 309-314.



УДК 579.64:573.6.086.83:631.811.98

Я.А. Коробов, Д.В. Каменёк, Л.К. Каменёк  
Ya.A. Korobov, D.V. Kamenyok, L.K. Kamenyok

## РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА BACILLUS THURINGIENSIS В ОТНОШЕНИИ ЮВЕНИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ ПЕРЦА СТРУЧКОВОГО

### GROWTH-PROMOTING EFFECT OF BACILLUS THURINGIENSIS DELTA-ENDOTOXIN ON JUVENILE PLANTS OF CAPSICUM ANNUUM

**Ключевые слова:** дельта-эндотоксин, *Bacillus thuringiensis*, гетероауксин, аскорбиновая кислота, ростостимулирующий эффект, семена перца стручкового, всхожесть, энергия прорастания, реактив Сальковского, реактив Жиру.

Целью исследования явилось изучение ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на перец стручковый (*Capsicum annuum* L.). Главным критерием использования дельта-эндотоксина в качестве ростостимулятора растений является его экологическая безопасность и лабораторной всхожести семян при последовательном увеличении концентрации раствора дельта-эндотоксина от 0,1 до 0,7%. Далее наблюдалось уменьшение энергии прорастания и лабораторной всхожести семян при концентрации от 0,7 до 1,5%. Оценка влияния различных концентраций раствора дельта-эндотоксина на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян показала, что наиболее оптимальной и эф-

фективной для предпосевного замачивания является концентрация 0,7%. Выявлено стимулирующее действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*, приводящее к повышению биометрических и биохимических показателей ювенильных проростков перца стручкового. При предварительной обработке семян раствором дельта-эндотоксина в концентрации 0,7% отмечено увеличение длины корня на 18,5%, длины листа по средней жилке – на 4,8, длины стебля – на 5,5, обхвата стебля – на 30, массы проростков – на 34,5%. При постоянной обработке семян раствором дельта-эндотоксина в концентрации 0,7% отмечено увеличение длины корня на 13,9%, обхвата стебля – на 12,5, массы проростков – на 9,4%. Установлено усиление синтеза в тканях проростков растений гетероауксина на 40%, аскорбиновой кислоты – на 30%. Полученные результаты могут быть как следствием прямого стимулирующего воздействия дельта-эндотоксина на растения, так и быть вызванными общим оздоровлением растений.

**Keywords:** delta endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, heteroauxin, ascorbic acid, grow-promoting effect, seeds of *Capsicum annuum*, germination, germination power, Salkowski reagent, Giroux reagent.

The research goal was study the growth-promoting effect of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin on hot pepper (*Capsicum annuum* L.). The main criterion of delta endotoxin application as plant growth promoter is its environmental safety. Increased germination power and laboratory seed germination was revealed with progressive increase of delta endotoxin solution concentration from 0.1 to 0.7%. Then reduced germination power and laboratory seed germination was observed at the concentration from 0.7 to 1.5%. The comparison of the effect of different delta endotoxin solution concentrations on germination power and laboratory seed germination showed that 0.7% concentration was

the most optimum and effective for pre-seeding soaking. A promoting effect of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin was found; it consisted in increased biometric and biochemical indices of juvenile seedlings of *Capsicum annuum*. Pre-seeding treatment of seeds with delta endotoxin solution of 0.7% concentration increased the root length by 18.5%, leaf length along the costa by 4.8%, stem length by 5.5%, stem circumference by 30% and seedling weight by 34.5%. Continuous seed treatment with delta endotoxin solution of 0.7% concentration increased the root length by 13.9%, stem circumference by 12.5% and seedling weight by 9.4%. The synthesis of heteroauxin in seedling tissues increased by 40%, and ascorbic acid synthesis increased by 30%. The obtained results may be caused both by a direct promoting effect of delta endotoxin on the plants, and by general plant health improvement.

**Коробов Яков Александрович**, аспирант, Ульяновский государственный университет. E-mail: jko-ro@bk.ru.

**Каменёк Дмитрий Валерьевич**, к.б.н., ст. преп., Ульяновский государственный университет. E-mail: kameneklk@mail.ru.

**Каменёк Людмила Кирилловна**, д.б.н., проф., Ульяновский государственный университет. E-mail: kameneklk@mail.ru.

**Korobov Yakov Aleksandrovich**, Post-Graduate Student, Ulyanovsk State University. E-mail: jko-ro@bk.ru.

**Kamenyok Dmitriy Valeryevich**, Cand. Bio. Sci., Asst. Prof., Ulyanovsk State University. E-mail: kameneklk@mail.ru.

**Kamenyok Lyudmila Kirillovna**, Dr. Bio. Sci., Prof., Ulyanovsk State University. E-mail: kameneklk@mail.ru.

### Введение

Внедрение интенсивных технологий возделывания сельскохозяйственных культур, предполагающее широкое использование химических удобрений, пестицидов и стимуляторов роста, приводит к ухудшению экологической ситуации. Применение биопрепаратов позволяет существенно уменьшить нагрузку на агроценозы, возникающую в результате использования химических пестицидов и стимуляторов роста. В настоящее время в растениеводстве широко используются биологические ростостимулирующие препараты: «НВ-101», «Новосил», «Циркон», «Эпин-Экстра», «Гумистар» и др. [1].

Основными источниками биологических ростостимуляторов являются бактерии. Так, бактерии рода *Rhizobium* вызывают образование бактериальных клубеньков, бактерии рода *Pseudomonas* подавляют размножение патогенных микроорганизмов, предотвращая их негативное влияние на растения [2]. В литературе имеются данные о том, что ростостимулирующее действие проявляется у некоторых подвидов *Bacillus thuringiensis*. В частности, отмечена способность дельта-эндотоксина стимулировать развитие проростков фасоли и огурца [3].

Известно, что функциональным компонентом *B. thuringiensis* являются параспоральные кристаллы дельта-эндотоксина, синтез которого детерминирован не только в плазмидах, но и в геноме бактерий [4].

Известно также, что дельта-эндотоксин обладает бактерицидными и фунгицидными свойствами в отношении целого ряда фитопатогенов [5, 6].

В связи с этим целью работы является изучение возможного ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на перец стручковый.

### Методика исследования

В работе использовали *B.thuringiensis ssp. thuringiensis* шт 202 в качестве продуцента дельта-эндотоксина. Культура получена из ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Москва). В качестве объекта исследования использовали семена перца стручкового сорта Раннее чудо производства фирмы «Выращиваем вместе». Поверхностное культивирование *B. thuringiensis* осуществляли в термостатах при 27°C в чашках Петри на питательной среде РПА.

Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксина и споры продуцента, отмывали от водорастворимых токсинов путем центрифугирования водной суспензии при 3000 об/мин. в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали и удаляли элементы твердой питательной среды центрифугированием при 500 об/мин. в течение 5 мин. Полученный супернатант содержал спорово-кристаллический комплекс. Кристаллы отделяли от спор путём экстракции в двухфазной сис-

теме: хлороформ – водный раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Верхняя (водная) фаза содержала кристаллы и была практически свободна от спор. Кристаллы растворяли, доводя pH раствора до 10. Доочистку дельта-эндотоксина осуществляли микрофильтрацией (диаметр пор 0,4 мкм). Количество белкового дельта-эндотоксина определяли по методу Лоури [7].

Энергию прорастания семян определяли на 4-й день инкубации. Для этого подсчитывали число проросших семян от первоначально взятого количества и выражали в процентах. Лабораторную всхожесть семян устанавливали на 7-й день проращивания. Для этого подсчитывали число проросших семян от первоначально взятого количества и выражали в процентах [8].

Влияние концентрации дельта-эндотоксина на всхожесть и энергию прорастания семян устанавливали в ходе проращивания семян в чашках Петри на бумажной подложке, обработанной растворами дельта-эндотоксина в концентрации от 0,1 до 1,5%.

Далее опытные образцы инкубировали в 0,7%-ном растворе дельта-эндотоксина в течение 30 мин., а контрольные – в воде. Дальнейшее проращивание семян осуществляли в пробирках на стерильном увлажненном песке при 28-30°C в условиях шестнадцатичасового светового дня. Полив проводили с интервалом в 24 ч в течение 10 сут. В варианте с предварительной обработкой полив осуществлялся водой, в варианте с постоянной обработкой – раствором дельта-эндотоксина 0,7%. В каждом варианте оценивали по 20 растений [8].

Для определения гетероауксина и аскорбиновой кислоты растения фиксировали, проводя через серию спиртовых растворов 20%, 40%, 60%, 80% по 30 мин., 96% и 100% – в течение 1 ч в каждом. Полученный материал пропитывали последовательно смесью абсолютного спирта и ксилола в соотношениях 3:1, 2:2 и 1:3 по 1 ч в каждом. Фиксацию заканчивали замещением промежуточной жидкости парафином, используя ксилол и парафин при температуре 56°C до полного испарения ксилола в течение 3-6 сут. с последующей заливкой материала в парафин. При помощи микротомы получали срезы толщиной 8 мкм и наклеивали их на предметные стекла. Препарат просушивали при 40-50°C, удаляли парафин последовательно ксилолом, 96%-ным спиртом и дистиллированной водой, обезвоживали в течение 2 ч 96%- и 100%-ными растворами этилового спирта. Спирт в срезах замещали на ксилол. Срезы заключали в канадский бальзам и просушивали [9].

Окрашивание гетероауксина проводили с использованием реактива Сальковского, состоящего из 0,1 г железоаммонийных квас-

цов и 100 мл 50%-ного раствора серной кислоты в течение 20 мин. при комнатной температуре [9].

Определение аскорбиновой кислоты проводили с использованием реактива Жиру, представляющего смесь 5%-ного раствора нитрата серебра и 5%-ного раствора уксусной кислоты в течение 15-20 мин. в темноте. Наблюдали выпадение черных кристаллов восстановленного серебра [9].

Обработку полученных данных проводили по методике «МЕКОС», на микроскопе Zeiss AxioStarplus [10].

Все эксперименты осуществляли в 10-кратной повторности по 20 растений в каждой. Все полученные данные подвергли статистической обработке по методу Стьюдента [11].

### Обсуждение результатов

Оценка влияния дельта-эндотоксина в различных концентрациях на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян показала, что наиболее оптимальной и эффективной для предпосевного замачивания является концентрация 0,7%. Полученные результаты демонстрируют увеличение энергии прорастания при увеличении концентрации раствора дельта-эндотоксина от 0,1 до 0,7% (рис. 1). Далее наблюдается уменьшение энергии прорастания при увеличении концентрации дельта-эндотоксина от 0,7 до 1,5%.

Полученные данные демонстрируют возростание лабораторной всхожести семян при увеличении концентрации раствора дельта-эндотоксина от 0,1 до 0,7% (рис. 2). Далее наблюдали уменьшение лабораторной всхожести при увеличении концентрации дельта-эндотоксина от 0,7 до 1,5%.

В таблице представлены результаты, показывающие увеличение массы проростков, по сравнению с контрольными образцами, на 34,5% при предварительной обработке дельта-эндотоксином на 9,4% при обработке растений дельта-эндотоксином в течение всего эксперимента. Показано увеличение длины корня на 18,4% при предварительной обработке дельта-эндотоксином и на 13,9% при постоянном его использовании. Полученные результаты показывают также увеличение обхвата стебля на 30,1 и на 12,5% соответственно. Следует отметить увеличение длины стебля на 5,5% и длины листа по средней жилке на 4,8 % при предварительной обработке, в то время как при постоянной обработке увеличения показателей не наблюдалось.

Важным показателем, характеризующим рост растений и устойчивость к неблагоприятным факторам среды, является содержание в тканях растений гетероауксина и аскорбиновой кислоты.

Гетероауксин, р-индолилуксусная кислота (ИУК), являющаяся производным индола, синтезируется в растении из аминокислоты триптофана. Образование ИУК зависит от снаб-

жения растения питательными веществами, особенно азотом и водой. ИУК образуется в очень малых количествах.

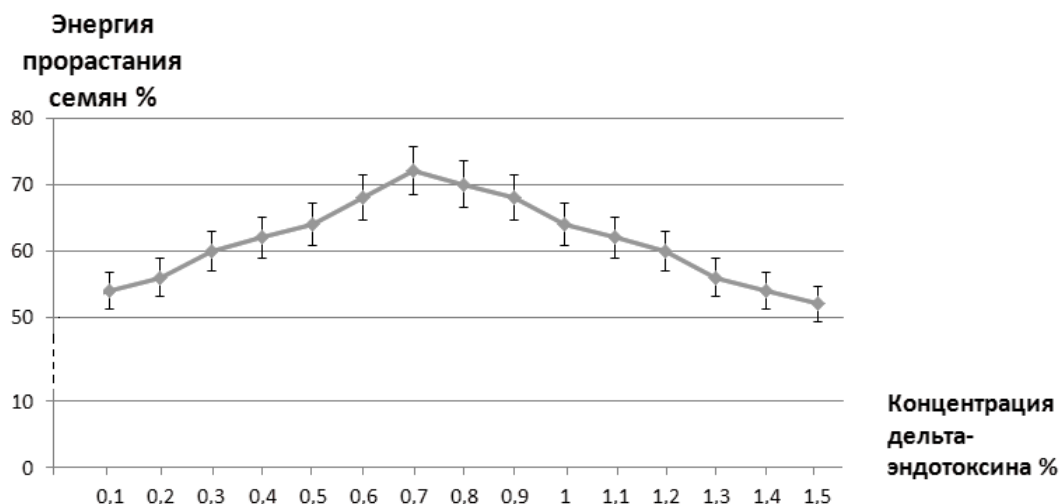


Рис. 1. Влияние дельта-эндотоксина на энергию прорастания семян сорта Раннее чудо перца стручкового (через 4 сут. инкубации)

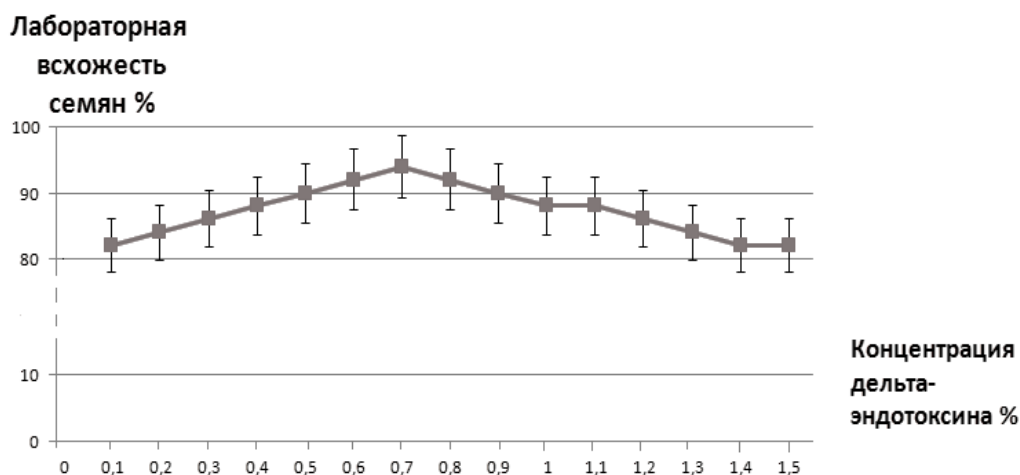


Рис. 2. Влияние дельта-эндотоксина на лабораторную всхожесть семян сорта Раннее чудо перца стручкового (7 сут.)

Таблица

Влияние дельта-эндотоксина на морфологические показатели перца стручкового

Вариант опыта	Сырая масса проростка, г	Длина стебля, мм	Длина корня, мм	Длина листа по средней жилке, мм	Обхват стебля, мм	
1 Контроль	0,173±0,004	37,0±0,4	31±0,4	20±0,2	3,5±0,1	
2 Дельта-эндотоксин (предварительная обработка)*	0,264±0,006	35,0±0,5	38±0,5	21±0,3	5,0±0,1	
3 Дельта-эндотоксин **	0,191±0,003	37,0±0,4	36±0,4	20±0,2	4,0±0,1	
Разница по сравнению с контролем (%)	2	34,470±0,360	5,5±0,1	18,4±0,2	4,8±0,1	30,1±0,3
	3	9,420±0,080	0	13,9±0,1	0	12,5±0,1

Примечание. P = 0,99, α = 0,01.

\* Семена обрабатывали дельта-эндотоксином только перед посадкой, в дальнейшем осуществляли полив дистиллированной водой.

\*\* Растения обрабатывали раствором дельта-эндотоксина в течение всего периода.

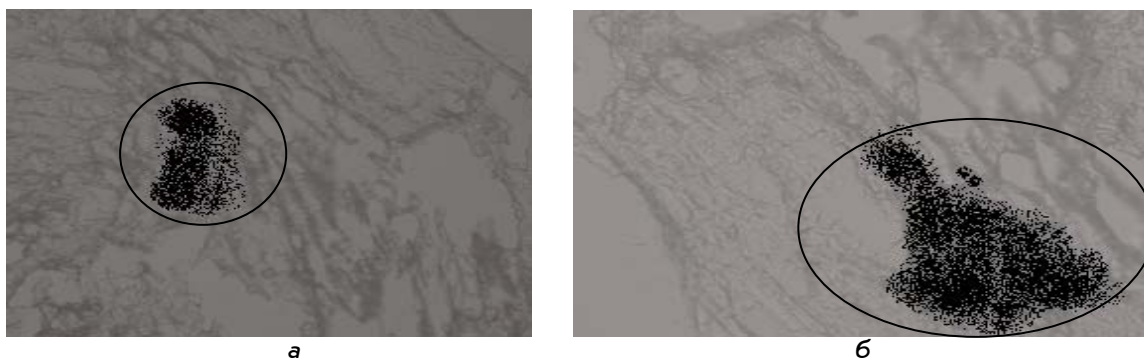


Рис. 3. Влияние дельта-эндотоксина на синтез гетероауксина:  
а – контроль; б – дельта-эндотоксин

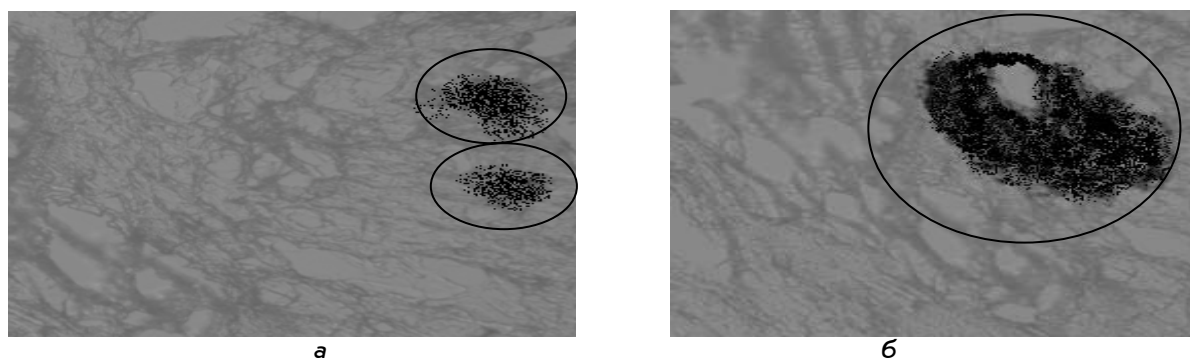


Рис. 4. Влияние дельта-эндотоксина на синтез аскорбиновой кислоты:  
а – контроль; б – дельта-эндотоксин

У высших растений ИУК синтезируется, прежде всего, в верхушечной меристеме и в прилегающих к ней молодых листочках, в растущих зародышах, семяпочках и семядолях, верхушках корней.

Гетероауксин, являясь растительным гормоном, контролирует разнообразные обменные процессы в растительных тканях, как анаболические, так и катаболические, усиливая рост тканей и всего растения [12].

На микрографии представлена типичная картина изменения содержания гетероауксина (рис. 3). Площадь окрашенных кристаллов гетероауксина в меристеме перца стручкового в контрольном образце составляет  $30 \pm 1$  мкм, а на экземпляре с дельта-эндотоксином –  $50 \pm 2$  мкм.

В настоящее время полагают, что аскорбиновая кислота синтезируется в растениях из Д-глюкозы и Д-галактозы независимыми путями.

Больше всего аскорбиновой кислоты синтезируется в листьях растений, особенно на солнечной стороне. В период подготовки к цветению количество аскорбиновой кислоты достигает максимума. Растения, содержащие большое количество аскорбиновой кислоты, характеризуются повышенной морозо- и газоустойчивостью. Участвуя в окислительно-восстановительных процессах в растительном организме, аскорбиновая кислота оказывает активирующее действие на ферменты, явля-

ясь коферментом, способствует нормальному развитию и повышению сопротивляемости организма к неблагоприятным факторам внешней среды [13].

На микрографии представлена типичная картина зон распределения аскорбиновой кислоты (рис. 4). Площадь окрашенных кристаллов аскорбиновой кислоты в тканях перца стручкового в контрольном варианте составляет  $60 \pm 1$  мкм, а на образце с дельта-эндотоксином –  $90 \pm 2$  мкм.

Таким образом, выявлены выраженный ростостимулирующий эффект дельта-эндотоксина на растения перца стручкового и связанное с увеличением интенсивности роста усиление синтеза гетероауксина и аскорбиновой кислоты.

Установленные эффекты могут являться как следствием прямого стимулирующего воздействия дельта-эндотоксина на растения, так и быть вызванными общим оздоровлением растений, связанным с подавлением фитопатогенов, которыми могут быть контаминированы семена. Антифитопатогенные свойства дельта-эндотоксина отмечены в ряде публикаций [6, 14].

#### Выводы

1. Предварительная обработка семян перца стручкового раствором кристаллов дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* в концентрации 0,7%, а также обработка растений в те-

чение всего эксперимента обеспечивают достоверное увеличение морфометрических показателей (длины листа по средней жилке, обхвата стебля, массы растения, длины корня).

2. Обработка дельта-эндотоксином *Bacillus thuringiensis* приводит к достоверному увеличению синтеза гетероауксина (40%) и аскорбиновой кислоты (30%).

#### Библиографический список

1. Безуглова О.С. Удобрения, биодобавки и стимуляторы роста вашего урожая. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. – 254 с.

2. Соколов М.С., Литвишко Е.В. Биологическая защита растений // Защита растений. – СПб., 1993. – № 11. – С. 25-31.

3. Терёхина Л.Д., Терёхин Д.А. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как стимулирующий агент развития ювенильных растений INVITRO // Матер. 12-й Международ. Пущинской конф. – Пущино, 2008. – С. 229-230.

4. Schnepf H.E., Wong H.C., Whiteley H.R. The amino-acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260 (10). – P. 6264-6272.

5. Юдина Т.Т., Бурцева Л.И. Действие эндотоксинов четырёх подвидов *Bacillus thuringiensis* на различных прокариот // Микробиология. – 1997. – Т. 66. – № 1. – С. 25-31.

6. Каменёк Л.К. и др. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении фитопатогенных грибов родов *Phytophthora* и *Fusarium* // Биотехнология. – 2005. – № 1. – С. 76-83.

7. Каменёк Л.К. Выделение и очистка кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Бюлл. научно-техн. информации. – Новосибирск, 1981. – № 2 (3). – С. 14-15.

8. ГОСТ 123038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести». – М.: Минсельхоз СССР, 1986. – С. 29.

9. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – С. 111-112.

10. ГОСТ 8074-82 «Микроскопы инструментальные». – М.: ГК СССР по стандартам, 1986. – С. 3-4.

11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 193-196.

12. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 2006. – С. 742-743.

13. Рубин Б.А. Физиология сельскохозяйственных растений. – М.: Изд-во Моск. унта, 1967. – С. 496-497.

14. Каменёк Л.К. и др. Изучение ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина на примере растений огурца // Вестник НГАУ. – 2010. – № 4. – С. 13-18.

#### References

1. Bezuglova O.S. Udobreniya, biodobavki i stimulyatory rosta vashogo urozhaya. – Rostov-na-Donu: Feniks, 2007. – 254 s.

2. Sokolov M.S., Litvishko E.V. Biologicheskaya zashchita rastenii // Zashchita rastenii. – 1993. – № 11. – S. 25-31.

3. Terekhina L.D., Terekhin D.A. Del'ta-endotoksin *Bacillus thuringiensis* kak stimulyuyushchii agent razvitiya yuvenil'nykh rastenii IN VITRO // Mater. 12-i mezhdunar. Pushchinskoi konferentsii. – Pushchino, 2008. – S. 229-230.

4. Schnepf H.E., Wong H.C., Whiteley H.R. The amino-acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260 (10). – P. 6264-6272.

5. Yudina T.T., Burtseva L.I. Deistvie endotoksinov chetyrekh podvidov *Bacillus thuringiensis* na razlichnykh prokariot // Mikrobiologiya. – 1997. – Т. 66. – № 1. – С. 25-31.

6. Kamenek L.K. i dr. Deistvie del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* v otnoshenii fitopatogennykh gribov rodov *Phytophthora* i *Fusarium* // Biotekhnologiya. – 2005. – № 1. – С. 76-83.

7. Kamenek L.K. Vydelenie i ochistka kristallov *Bacillus thuringiensis* // Byull. nauchnotekhn. informatsii. – 1981. – № 2 (3). – С. 14-15.

8. GOST 123038-84 Semena sel'skokhozyaistvennykh kul'tur. Metody opredeleniya vskhozhesti. – М.: Minsel'khoz SSSR, 1986. – С. 29.

9. Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rastenii. – М.: Agropromizdat, 1988. – С. 111-112.

10. GOST 8074-82 Mikroskopy instrumental'nye. – М.: GK SSSR po standartam, 1986. – С. 3-4.

11. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta. – М.: Agropromizdat, 1985. – С. 193-196.

12. Kuznetsov V.V., Dmitrieva G.A. Fiziologiya rastenii. – М.: Vysshaya shkola, 2006. – С. 742-743.

13. Rubin B.A. Fiziologiya sel'skokhozyaistvennykh rastenii. – М.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1967. – С. 496-497.

14. Kamenek L.K. i dr. Izuchenie rostostimulyuyushchego deistviya del'ta-endotoksina na primere rastenii ogurtsa // Vestnik NGAU. – 2010. – № 4. – С. 13-18.

