

УДК 579.64:573.6.086.83:631.811.98
DOI 10.23648/UMBJ.2017.25.5259

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОГУРЦА ПОСЕВНОГО ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНОМ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Л.Ф. Усеева, Д.В. Каменек, Л.К. Каменек,
Я.А. Коробов, Л.Д. Терехина, С.Н. Коршунова

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

e-mail: liliyabasyrova@yandex.ru

Для обеспечения высокой урожайности сельскохозяйственных культур важное значение имеет использование широкого арсенала средств, включая препараты ростостимулирующего действия. Объектами исследования явились растения огурца посевного сортов Конкурент, Журавленок, Фермер и промышленный штамм продуцента дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Всхожесть и энергию прорастания оценивали согласно ГОСТ 123038-84. Наиболее значимые изменения отмечены для сорта Конкурент при концентрации дельта-эндотоксина 0,075 %: энергия прорастания увеличилась на 5,7 %, всхожесть – на 4,2 %. Отмечено выраженное стимулирование набухания семян сортов Конкурент (на 8 и 17,4 % через 17 и 25 ч соответственно) и Журавленок (на 25 и 30 %). В случае сорта Фермер стимулирование на 15 % установлено только после 25 ч замачивания. Дельта-эндотоксин достоверно усиливал поступление воды по сравнению с контролем на 30 % для сорта Журавленок, в меньшей степени – для сортов Конкурент и Фермер (15 и 12 % соответственно). Обработка семян огурца раствором дельта-эндотоксина способствовала увеличению длины проростка на 4–10 мм по сравнению с контролем. Вероятной причиной улучшения показателей набухания, энергии прорастания, всхожести и длины проростков является оздоровление посевного материала за счет антибиотической активности дельта-эндотоксина в отношении фитопатогенных бактерий.

Ключевые слова: огурец посевной, дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*, энергия прорастания, всхожесть, интенсивность набухания.

Введение. Для обеспечения высокой урожайности сельскохозяйственных культур важное значение имеет использование широкого арсенала средств, включая препараты ростостимулирующего действия.

В настоящее время применяется значительное количество препаратов для стимулирования роста и развития растений, однако большинство из них – химические (дихлордифенилтрихлорэтан, тиодан, дилор и др.). Их недостатком является токсичность для полезной энтомофауны и теплокровных животных [1]. Вместе с тем в последнее время появились биологические стимуляторы роста растений на основе продуктов жизнедеятельности низших грибов, актиномицетов и бактерий, такие как фитобактериомицин, трихотецин, биомицин, которые не только снижают поражаемость растений патогенами, но и стимулируют процессы роста и развития.

В настоящее время в сельскохозяйственной практике широко применяются биопестициды на основе споро-кристаллического комплекса и отдельных параспоральных белков (дельта-эндотоксинов) грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis*. Преимуществами данных биопестицидов по сравнению с химическими средствами являются высокая специфичность действия, отсутствие загрязняющих остатков и сравнительно низкая стоимость [2, 3].

Показан антибиотический эффект дельта-эндотоксинов в отношении ряда микроорганизмов, включая бактериальные и грибные фитопатогены [4, 5]. Кроме того, отмечено ростостимулирующее влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на растения [6]. Оздоровление растений, связанное с угнетением фитопатогенов, неизбежно должно привести к интенсификации обменных процессов

в тканях и, как следствие, к улучшению морфометрических показателей, повышению всхожести семян и энергии их прорастания. Изучению данных закономерностей посвящена настоящая статья.

Цель исследования. Изучение влияния дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на морфометрические показатели огурца посевного.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на морфометрические показатели.

2. Оценить действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на всхожесть семян и энергию прорастания.

Материалы и методы. В работе были использованы семена огурца посевного сортов Конкурент, Журавленок и Фермер с одинаковыми морфометрическими показателями.

В качестве продуцента дельта-эндотоксина использовали *B. thuringiensis subsp. kurstaki* Z-52, полученную из ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Пушкино).

Поверхностное культивирование бактерии осуществляли в термостатах при 27 °С в чашках Петри на питательной среде РПА (рыбо-пептонный агар). Оценивали качество выращенной культуры и эффективность кристаллообразования [7].

Для получения раствора дельта-эндотоксина биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы дельта-эндотоксина и споры продуцента, отмывали от водорастворимых токсинов путем центрифугирования 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 бактериальные клетки, споры и кристаллы. Кристаллы отделяли от спор экстракцией в двухфазной системе: хлороформ – водный раствор Na₂SO₄. Водная фаза содержала кристаллы и была практически свободна от спор. Кристаллы подвергали щелочному гидролизу по методике Кукси [8]. Нерастворившийся материал осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Использовали свежеприготовленные

растворы кристаллов. Концентрацию белкового дельта-эндотоксина оценивали по методу Лоури (МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям»).

Семена огурца предварительно дезинфицировали поверхностно 0,5 % раствором KMnO₄ (15 мин) с последующим многократным промыванием стерильной дистиллированной водой. Подготовленный таким образом материал помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу. В чашки добавляли по 10 мл раствора дельта-эндотоксина разных концентраций и инкубировали в течение 30 мин. Контролем служили семена, обработанные дистиллированной водой. Семена проращивали в термостате при температуре 27 °С. Через 17 и 25 ч инкубации учитывали количество наклонувшихся семян и их массу.

Об интенсивности набухания семян судили по изменению массы семян в процессе проращивания. Интенсивность рассчитывали по формуле

$$\Delta M = (M_k - M_c) / M_c \cdot 100 \%,$$

где ΔM – интенсивность набухания, %; M_k – масса семян на конец учетного периода, г; M_c – масса сухих семян, г.

Все опыты проводили в пятикратной повторности по 30 семян в каждой.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью методов математической статистики и компьютерной программы Excel 2003. Достоверность результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В процессе исследования была проанализирована динамика всхожести семян в лабораторных условиях в первые трое суток. Согласно ГОСТ 123038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести» всхожесть семян – это их способность давать за определенный срок проростки в лаборатории или всходы в полевых условиях. Спустя одни сутки замачивания в контроле в зависимости от сорта проросло 12–15 % семян, через двое суток – 45–50 %, через трое суток – 92–95 %.

Результаты исследований, представленные в табл. 1, демонстрируют достоверное

увеличение относительно контроля энергии прорастания и всхожести семян сорта Конкурент через трое суток после начала замачивания при всех концентрациях дельта-эндотоксина. При концентрации 0,03 % энергия прорастания увеличилась на 3,5 %, всхожесть – на 2,1 %. Наиболее значимые изменения характерны для концентрации 0,075 %: энергия прорастания увеличилась на 5,7 %, всхожесть – на 4,2 %. Для сортов Журавленок и Фермер достоверные изменения наблюдали только для концентрации 0,075 %:

для энергии прорастания – 2,2 и 2,3 %, для всхожести – 4,3 и 3,2 % соответственно. Следует отметить, что увеличение концентрации токсина до 0,15 % не приводило к дальнейшему повышению энергии прорастания и всхожести семян всех изученных сортов. Напротив, во всех случаях наблюдали уменьшение эффекта по сравнению с более низкими концентрациями.

Для дальнейших исследований была выбрана концентрация 0,075 %, показавшая наиболее значительную эффективность.

Таблица 1

Влияние дельта-эндотоксина на посевные качества семян огурца

Вариант опыта	Энергия прорастания, %	Разность с контролем, %	Всхожесть, %	Разность с контролем, %	
Концентрация 0,03 %	сорт Конкурент				
	Контроль	87,0±1,5	-	95,0±0,8	-
	Дельта-эндотоксин	90,0±0,6*	3,5	97,0±0,8*	2,1
	сорт Фермер				
	Контроль	88,0±1,2	-	94,0±1,1	-
	Дельта-эндотоксин	89,0±1,3	1,1	96,0±0,9	2,1
	сорт Журавленок				
	Контроль	90,0±1,8	-	92,0±1,0	-
	Дельта-эндотоксин	91,0±1,9	1,1	95,0±1,2	3,3
Концентрация 0,075 %	сорт Конкурент				
	Контроль	87,0±1,5	-	95,0±0,8	-
	Дельта-эндотоксин	92,0±1,1*	5,7	99,0±1,7*	4,2
	сорт Фермер				
	Контроль	88,0±1,2	-	94,0±1,1	-
	Дельта-эндотоксин	90,0±2,9*	2,3	97,0±3,9*	3,2
	сорт Журавленок				
	Контроль	90,0±1,8	-	92,0±1,0	-
	Дельта-эндотоксин	92,0±4,7*	2,2	96,0±5,1*	4,3
Концентрация 0,15 %	сорт Конкурент				
	Контроль	87,0±1,5	-	95,0±0,8	-
	Дельта-эндотоксин	89,0±2,4*	2,3	96,0±1,0	1,0
	сорт Фермер				
	Контроль	88,0±1,2	-	94,0±1,1	-
	Дельта-эндотоксин	89,0±7,4	1,1	95,0±6,8	1,1
	сорт Журавленок				
	Контроль	90,0±1,8	-	92,0±1,0	-
	Дельта-эндотоксин	91,0±8,7	1,1	93,0±9,3	1,1

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Учитывая более ранний выход из состояния покоя семян, обработанных раствором дельта-эндотоксина, можно предположить, что интенсивность прорастания связана с ускорением поступления воды в семя. Поглощение семенем воды на начальном этапе по-

лучило название набухания семян [1]. При поглощении воды увеличивается объем и масса семени. В табл. 2 представлены результаты исследований, демонстрирующие влияние дельта-эндотоксина на интенсивность набухания семян.

Таблица 2

Изменение массы семян (набухание) под действием дельта-эндотоксина в концентрации 0,075 %

Вариант опыта	Масса семян**, г				
	Через 3 ч	Через 17 ч	Разность с контролем, %	Через 25 ч	Разность с контролем, %
сорт Конкурент					
Контроль	2,20±0,01	3,40±0,01	-	4,50±0,07	-
Дельта-эндотоксин	2,20±0,01	3,50±0,02*	8	4,90±0,06*	17,4
сорт Фермер					
Контроль	2,20±0,02	3,30±0,03	-	4,10±0,07	-
Дельта-эндотоксин	2,20±0,01	3,30±0,03	0	4,40±0,05*	15,8
сорт Журавленок					
Контроль	2,10±0,01	3,30±0,03	-	4,10±0,10	-
Дельта-эндотоксин	2,10±0,01	3,60±0,03*	25	4,70±0,07*	30

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$; ** – учитывается общая масса 30 семян.

Отмечено выраженное стимулирование набухания семян сортов Конкурент (на 8 и 17,4 % через 17 и 25 ч соответственно) и Журавленок (25 и 30 %). В случае сорта Фермер стимулирование на 15,8 % установлено только после 25 ч замачивания.

В табл. 3 представлены результаты, показывающие изменение под влиянием дельта-эндотоксина интенсивности набухания, которая характеризует силу поглощения воды семенем.

Через 25 ч интенсивность поступления воды в семена всех сортов была значительно выше, чем через 17 ч. Дельта-эндотоксин достоверно усиливал поступление воды по сравнению с контролем на 37 % для сорта Журавленок и на 25 % для сорта Конкурент.

В случае сорта Фермер интенсивность оказалась не столь ярко выраженной, но, несмотря на это, наблюдалось достоверное увеличение показателей на 19 %.

Описанное выше влияние дельта-эндотоксина способствовало дальнейшему стимулированию развития растений (табл. 4).

Обработка семян огурца раствором дельта-эндотоксина способствовала достоверному увеличению длины проростка на 4 и 10 мм по сравнению с контролем для сорта Конкурент, на 4 и 9 мм для сорта Журавленок и на 5 и 9 мм для сорта Фермер через 3 и 7 сут соответственно. Результаты исследований показали наличие общей динамики увеличения длины проростка по всем трем сортам.

Таблица 3

Влияние дельта-эндотоксина в концентрации 0,075 % на интенсивность набухания семян

Вариант опыта	Интенсивность набухания семян**, %			
	Через 17 ч	Разность с контролем, %	Через 25 ч	Разность с контролем, %
сорт Конкурент				
Контроль	112,0±2,1	-	181,0±5,3	-
Дельта-эндотоксин	118,0±1,4	6	206,0±4,8*	25
сорт Фермер				
Контроль	106,0±2,3	-	156,0±3,2	-
Дельта-эндотоксин	106,0±2,7	0	175,0±4,2*	19
сорт Журавленок				
Контроль	106,0±2,5	-	156,0±3,6	-
Дельта-эндотоксин	125,0±4,2*	19	193,0±5,7*	37

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$; ** – масса 30 сухих семян составляла $1,6 \pm 0,03$ г для всех сортов.

Таблица 4

Влияние дельта-эндотоксина на длину проростков огурца

	Длина проростков, мм			
	3 сут		7 сут	
	Контроль	Дельта-эндотоксин	Контроль	Дельта-эндотоксин
Сорт Конкурент	15,9±2,6	20,2±2,7	43,2±4,7	53,0±4,2*
Сорт Журавленок	14,0±2,3	17,9±2,1	40,5±4,6	49,0±4,6*
Сорт Фермер	16,0±2,0	21,1±2,6	44,1±4,1	53,6±4,0*

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что обработка дельта-эндотоксином приводит к значительному улучшению показателей набухания, энергии прорастания, всхожести и длины проростков. Вероятной причиной этого может являться оздоровление посевного материала за счет антибиотической активности дельта-эндотоксина в отношении фитопатогенных бактерий. Нельзя исключить также и прямое ростостимулирующее влияние на растения, однако это требует тщательной экспериментальной проверки.

Выводы:

1. Отмечено увеличение массы семян за счет изменения скорости поглощения воды и увеличения интенсивности набухания семян, обработанных раствором дельта-эндотоксина в концентрации 0,075 %.

2. Под действием дельта-эндотоксина значительно увеличилась энергия прорастания и всхожесть семян.

3. Обработка семян огурца раствором дельта-эндотоксина привела к увеличению длины образовавшихся проростков.

Литература

1. Терпиловский М.А. Перспективы использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как биорегулятора роста растений с фитозащитными свойствами. *Агро XXI*. 2010; 4–6: 31–33.
2. Коробов Я.А., Каменек Д.В., Каменек Л.К. Ростостимулирующий эффект дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении ювенильных растений перца стручкового. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2014; 11: 14–19.
3. Басырова Л.Ф., Каменек Д.В., Каменек Л.К., Терехина Л.Д. Влияние дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на биохимический состав плодов огурца посевого. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2014; 10: 14–17.
4. Терпиловский М.А. Антифунгальное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении фитофтороза картофеля в полевых условиях и при хранении. *Сельхозбиология*. 2011; 1: 112–118.
5. Мартыанова Д.И., Каменек Л.К. Дельта-эндотоксин как фактор антибиотической активности. Тезисы XIX Пушкинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». 20–24 апреля 2015. Пушкино; 2015: 186–187.
6. Басырова Л.Ф., Каменек Л.К. Особенности воздействия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на рост и развитие *Cucumis sativus* L. Тезисы XVII Пушкинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». 21–26 апреля 2013. Пушкино; 2013: 200–206.
7. Кольчевский А.Г., Рыбина Л.М., Коломиец В.Я. Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis* var. *Galleriae*: методические рекомендации. Л.; 1987; 13–15.
8. Cooksey K. E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of *Lepidoptera*. *Biochem. J.* 1968; 106: 445–454.

MORPHOMETRIC VARIATIONS OF CUCUMBER (*CUCUMIS SATIVUS*) SEEDS BY DELTA-ENDOTOXIN (*BACILLUS THURINGIENSIS*) TREATMENT

L.F. Useeva, D.V. Kamenek, L.K. Kamenek,
Y.A. Korobov, L.D. Terekhina, S.N. Korshunova

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: liliyabasyrova@yandex.ru

To achieve high crop yield it is important to use all the available agents, which includes agents for plants growth promoting. The objects under consideration are the plants of the Cucumber (cultivars "Konkurent", "Zhuravlenok", "Fermer") and the commercial strain of delta endotoxin producer Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Plant emergence and germinating energy were estimated according to State Standard 123038-84. The cultivars "Konkurent" showed the most significant change in the concentration 0,075 %: germinating energy improved up to 5,7 %, plant emergence increased up to 4,2 %. It was discovered the clear cut seeds swelling of the cultivars "Konkurent" (8 and 17,4 % in 17 and 25 hours respectively) and "Zhuravlenok" (25 and 30 % respectively). The cultivar "Fermer" indicated the 15 %-promotion after 25 hours of seeds steeping. Delta endotoxin truly increased the water entrance in comparison with the control set up to 30 % for "Zhuravlenok". For "Konkurent" and "Fermer" the water entrance was raised up to 15 and 12 % respectively. Treatment the cucumber seeds with delta endotoxin promoted the seedling lengthen to 4–10 mm in comparison with the control set. The performance improving of seeds swelling, plant emergence, germinating energy, and seedling length were caused by seeds enhancement through the delta endotoxin antibiotic activity onto phytopathogenic bacteria.

Keywords: *cucumber (*Cucumis sativus*), delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*, germinating energy, viability, swelling intensity.*

References

1. Terpilovskiy M.A. Perspektivy ispol'zovaniya del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* kak bioregulyatora rosta rasteniy s fitozashchitnymi svoystvami [Perspectives of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin usage as a Plant growth Bioregulator with PhytoProtective features]. *Агро XXI*. 2010; 4–6: 31–33

- (in Russian).
2. Korobov Ya.A., Kamenek D.V., Kamenek L.K. Rostostimuliruyushchiy effekt del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* v otnoshenii yuvenil'nykh rasteniy pertsy struchkovogo [Growth-promoting effect of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on juvenile plants of *Capsicum annuum*]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2014; 11: 14–19 (in Russian).
 3. Basyrova L.F., Kamenek D.V., Kamenek L.K., Terekhina L.D. Vliyanie del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* na biokhimicheskiy sostav plodov ogurtsa posevnogo [Bacillus thuringiensis delta-endotoxin influence on the biochemistry of a cucumber fruit *Cucumis sativus*]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2014; 10: 14–17 (in Russian).
 4. Terpilovskiy M.A. Antifungal'noe deystvie del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* v otnoshenii fitoftoroza kartofelya v polevykh usloviyakh i pri khranении [Antifungal effect of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in relation to late blight disease of potato in the field conditions and storage]. *Sel'khozbiologiya*. 2011; 1: 112–118 (in Russian).
 5. Mart'yanova D.I., Kamenek L.K. Del'ta-endotoksin kak faktor antibioticheskoy aktivnosti [Delta-endotoxin as the factor of antibiotic activity]. *Tezisy XIX Pushchinskoy konferentsii molodykh uchenykh «Biologiya – nauka XXI veka»* [Theses XIX Pushchino conference of young scientists "Biology – science of XXI century"]. 20–24 aprelya 2015. Pushchino; 2015: 186–187 (in Russian).
 6. Basyrova L.F., Kamenek L.K. Osobennosti vozdeystviya del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* na rost i razvitie *Cucumis sativus* L. Features of influence of the delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis* on the growth and development of *Cucumis sativus* L.]. *Tezisy XVII Pushchinskoy konferentsii molodykh uchenykh «Biologiya – nauka XXI veka»* [Theses XVII Pushchino conference of young scientists "Biology – science of XXI century"]. 21–26 aprelya 2013. Pushchino; 2013: 200–206 (in Russian).
 7. Kol'chevskiy A.G., Rybina L.M., Kolomiets V.Ya. Vydelenie i otbor vysokovirulentnykh kul'tur *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*: metodicheskie rekomendatsii [Allocation and selection of highly virulent cultures *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*]. L.; 1987; 13–15 (in Russian).
 8. Cooksey K. E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of Lepidoptera. *Biochem. J.* 1968; 106: 445–454.