

УДК 579.64:573.6.086.83:631.811.98  
DOI 10.23648/UMBJ.2017.26.6230

## РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ЮВЕНИЛЬНЫЕ РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ

Я.А. Коробов, Л.К. Каменек, В.М. Каменек, Л.Ф. Усеева

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

e-mail: jkoro@bk.ru

*Цель.* Изучение ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на пшеницу мягкую сорта «алтайская 105».

*Материалы и методы.* В работе был использован штамм 202 *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis*. В качестве объекта исследования – семена пшеницы яровой мягкой сорта «алтайская 105» фирмы «Живые продукты Алтая».

*Результаты.* Оценка влияния различных концентраций раствора дельта-эндотоксина на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян показала, что наиболее оптимальной и эффективной для предпосевного замачивания является концентрация 0,6 %. Выявлено стимулирующее действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*, приводящее к повышению биометрических и биохимических показателей ювенильных проростков пшеницы мягкой. Установлено усиление синтеза в тканях проростков растений гетероауксина и аскорбиновой кислоты. Выявленные эффекты могут быть следствием как прямого стимулирующего воздействия дельта-эндотоксина на растения, так и общего оздоровления растений.

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

**Введение.** Пшеница является ведущей зерновой культурой, обладает высокой интенсивностью и урожайностью. Она выращивается в разных почвенно-климатических условиях [1]. Это обуславливает разнообразие фитопатогенов, поражающих растения, и, как следствие, применение всевозможных пестицидов. Большинство применяемых пестицидов имеет небиологическое происхождение. Их систематическое использование негативно сказывается на продукции [2].

Экологизация сельского хозяйства доказывает возможность использования биологических агентов в качестве важного средства решения вопросов современной агротехники [3].

Особое внимание следует уделить проблеме иммунизации растений и стимуляции их роста. Предпосевная обработка семян биопрепаратами способствует более интенсивному накоплению биомассы растениями, увеличению синтеза витаминов и фитогор-

монов, а также повышению резистентности растений к фитопатогенам [4]. Кроме того, следует отметить сравнительно небольшую концентрацию рабочих растворов биопрепаратов и цикличность их применения [5].

Микробиологические препараты представляют собой как живые клетки отселектированных по полезным свойствам микроорганизмов, так и продукты их жизнедеятельности, оказывающие прямое либо опосредованное действие на растения [5]. В литературе имеются данные о том, что подобные свойства проявляются у некоторых подвидов *Bacillus thuringiensis*. В частности, отмечена способность дельта-эндотоксина стимулировать развитие проростков фасоли и огурца [6].

Известно, что функциональным компонентом *B. thuringiensis* являются параспоровые кристаллы дельта-эндотоксина, обладающие антибиотическими и антифунгальными свойствами в отношении целого ряда фитопатогенов [7, 8].

**Цель исследования.** Изучение возможного ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на пшеницу мягкую.

**Материалы и методы.** В работе в качестве продуцента дельта-эндотоксина был использован штамм 202 *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis*. Культура получена из ФГБУ ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Москва). В качестве объекта исследования использовали семена пшеницы яровой мягкой сорта «алтайская 105» фирмы «Живые продукты Алтай». Поверхностное культивирование *B. thuringiensis* осуществляли в термостатах при 27 °С в чашках Петри на питательной среде РПА.

Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксина и споры продуцента, отмывали дистиллированной водой от водорастворимых токсинов. Путем центрифугирования суспензии кристаллы и споры осаждали 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 последовательно путем флотации и экстракции в двухфазной среде хлороформ-водного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Щелочной гидролиз кристаллов проводили по методу Cooksey [9]. Затем раствор подвергали диализу и доводили водой до необходимой концентрации. рН раствора снижали до 7,8 титрованием 0,1 н.  $\text{HCl}$ . Дочистку дельта-эндотоксина осуществляли микрофильтрацией (диаметр пор 0,4 мкм). Количество белкового дельта-эндотоксина определяли по методу Лоури [10].

Энергию прорастания семян определяли на 4-й день инкубации путем подсчета числа проросших семян и выражали в процентах от первоначально взятого количества. Лабораторную всхожесть семян определяли на 7-й день проращивания. Для этого подсчитывали число проросших семян и выражали в процентах от первоначально взятого количества (ГОСТ 8074-82).

Влияние концентрации дельта-эндотоксина на всхожесть и энергию прорастания семян оценивали в ходе проращивания семян

в чашках Петри на бумажной подложке, обработанной растворами дельта-эндотоксина в концентрации от 0,1 до 1,5 %.

После этого опытные образцы обрабатывали в 0,6 % растворе дельта-эндотоксина в течение 30 мин, а контрольные – в воде. Дальнейшее проращивание семян осуществляли в пробирках на стерильном увлажненном песке при 28–30 °С в условиях шестнадцатичасового светового дня. Полив осуществляли с интервалом в 24 ч в течение 10 сут. В варианте с предварительной обработкой полив осуществлялся водой, в варианте с постоянной обработкой – 0,6 % раствором дельта-эндотоксина. В каждом варианте оценивали по 20 растений в соответствии с ГОСТ 123038–84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести».

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: использовали ксилол и парафин при температуре 56 °С 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 °С, удаляли парафин последовательно ксилолом, 96 % спиртом и дистиллированной водой, обезвоживали 96 и 100 % растворами этилового спирта в течение 2 ч. Спирт в срезах замещали на ксилол. Срезы заключали в канадский бальзам и просушивали [11].

Определение гетероауксина осуществляли с использованием реактива Сальковского, состоящего из 0,1 г железоаммонийных квасцов и 100 мл 50 % раствора серной кислоты, в течение 20 мин при комнатной температуре [11].

Окрашивание аскорбиновой кислоты проводили с использованием реактива Жиру, представляющего смесь 5 % раствора нитрата серебра и 5 % раствора уксусной кислоты, в течение 15–20 мин в темноте. Наблюдали

выпадение черных кристаллов восстановленного серебра [11].

Обработку полученных данных проводили по методике «МЕКОС» на микроскопе Zeiss Axiostarplus (ГОСТ 8074–82 «Микроскопы инструментальные»).

Все эксперименты проводили в 10-кратной повторности по 20 растений в каждой.

Все полученные данные подвергли статистической обработке по методу Стьюдента [12].

**Результаты и обсуждение.** Анализ влияния дельта-эндотоксина в разных концентрациях на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян показал, что наиболее эффективной для предпосевного замачивания является концентрация 0,6 % (рис. 1).

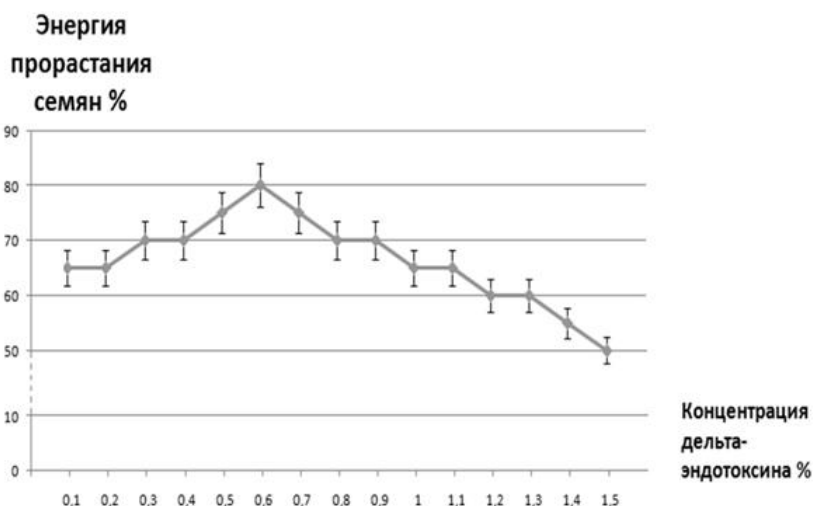


Рис. 1. Влияние дельта-эндотоксина на энергию прорастания семян пшеницы мягкой

Полученные данные демонстрируют возрастание энергии прорастания семян при увеличении концентрации раствора дельта-эндотоксина от 0,1 до 0,6 %. Далее при увеличении концентрации дельта-эндотоксина от 0,6 до 1,5 % наблюдается снижение энергии прорастания.

Анализ лабораторной всхожести семян показал, что при росте концентрации раствора дельта-эндотоксина от 0,1 до 0,6 % происходит увеличение всхожести (рис. 2), при увеличении концентрации дельта-эндотоксина от 0,6 до 1,5 % — уменьшение.

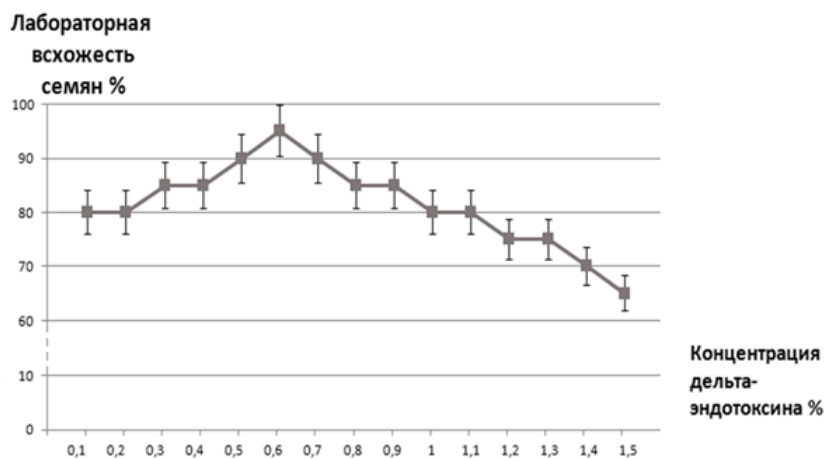


Рис. 2. Влияние дельта-эндотоксина на лабораторную всхожесть семян пшеницы мягкой

Таблица 1

## Влияние дельта-эндотоксина на морфологические показатели (n=200)

Вариант опыта		Сырая масса проростка, г	Длина стебля, мм	Длина корня, мм	Длина листа по средней жилке, мм	Обхват стебля, мм	
1	Контроль	0,203±0,006	103,0±0,5	52,0±0,5	61,0±0,4	3,0±0,1	
2	Дельта-эндотоксин (предварительная обработка)*	0,275±0,008	168,0±0,6	63,0±0,5	128,0±0,5	4,0±0,1	
3	Дельта-эндотоксин**	0,208±0,006	110,0±0,5	55,0±0,4	77,0±0,4	3,0±0,1	
Разница по сравнению с контролем, %		2	35,468	63,1	21,2	109,8	25
		3	2,463	6,8	5,8	26,2	0

**Примечание.** \* – семена обрабатывали дельта-эндотоксином только перед посадкой, в дальнейшем осуществляли полив дистиллированной водой; \*\* – растения обрабатывали раствором дельта-эндотоксина в течение всего периода.

В табл. 1 представлены результаты, демонстрирующие изменение морфометрических показателей проростков растений: увеличение массы проростков по сравнению с контрольными образцами на 35,4 % при предварительной обработке дельта-эндотоксином, на 2,4 % при обработке растений дельта-эндотоксином в течение всего эксперимента. Показано увеличение длины корня на 21,2 % при предварительной обработке дельта-эндотоксином и на 5,8 % при постоянном его использовании. Полученные результаты также демонстрируют увеличение обхвата стебля на 25 % при предварительной обработке, в то время как при постоянной обработке увеличения показателей не наблюдалось. Показано увеличение длины стебля на 63,1 % по сравнению с контролем при предварительной обработке и на 6,8 % – при постоянной. Отмечено увеличение длины листа по средней жилке на 109,8 и 26,2 % соответственно.

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

Гетероауксин (p-индолилуксусная кислота, ИУК), являющийся производным индола, синтезируется в растении из аминокислоты триптофана. Образование ИУК зависит от снабжения растения питательными веществ-

вами, особенно азотом и водой. ИУК образуется в очень малых количествах.

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 [13].

На микрографии (рис. 3) представлена типичная картина изменения содержания гетероауксина. Площадь окрашенных кристаллов гетероауксина в меристеме пшеницы мягкой в контрольном образце составляет  $40 \pm 1$  мкм, а на экземпляре с дельта-эндотоксином –  $60 \pm 2$  мкм.

В настоящее время полагают, что аскорбиновая кислота синтезируется в растениях из D-глюкозы и D-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, аскорбиновая

кислота оказывает активирующее действие на ферменты, являясь коферментом, способствует нормальному развитию и повышению сопротивляемости организма к неблагоприятным факторам внешней среды [14].

На микрографии (рис. 4) представлена типичная картина зон распределения аскорбиновой кислоты. Площадь окрашенных кри-

сталлов аскорбиновой кислоты в тканях пшеницы мягкой в контрольном варианте составляет  $50 \pm 1$  мкм, а на образце с дельта-эндотоксином –  $85 \pm 2$  мкм.

Таким образом, показано увеличение синтеза гетероауксина и аскорбиновой кислоты в тканях пшеницы мягкой и связанное с ним увеличение морфометрических показателей.

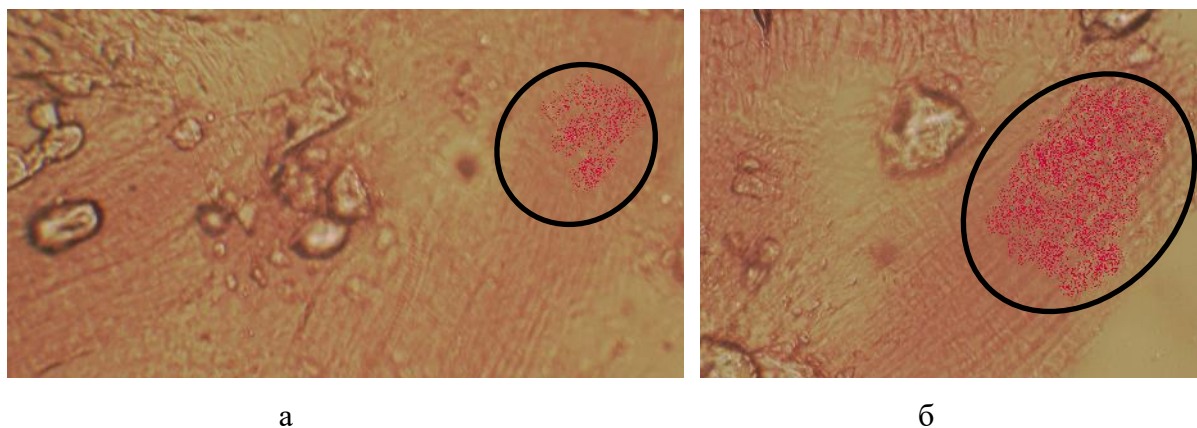


Рис. 3. Влияние дельта-эндотоксина на синтез гетероауксина: а) контроль; б) дельта-эндотоксин

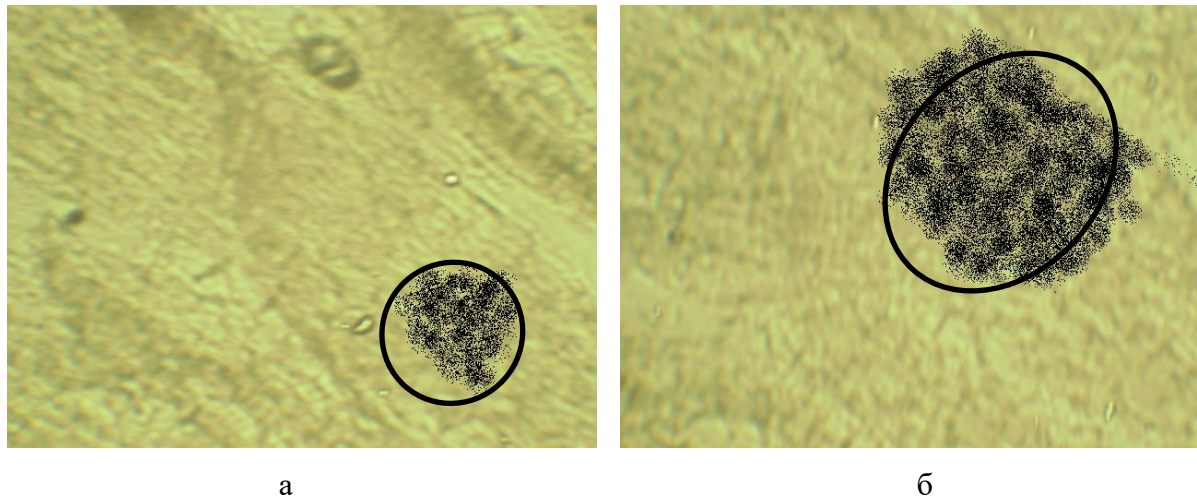


Рис. 4. Влияние дельта-эндотоксина на синтез аскорбиновой кислоты: а) контроль; б) дельта-эндотоксин

Выявленный ростостимулирующий эффект может быть следствием как прямого стимулирующего воздействия дельта-эндотоксина на растения, так и общего оздоровления растений, связанного с подавлением фитопатогенов, которыми могут быть загрязнены семена [15].

#### Выводы:

1. Предварительная обработка семян пшеницы мягкой раствором кристаллов дель-

та-эндотоксина *B. thuringiensis* в концентрации 0,6 %, а также обработка растений в течение всего эксперимента обеспечивает 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 (50 %) и аскорбиновой кислоты (70 %).

## Литература

1. Мелехина Т.С., Пинчук Л.Г. Урожайность и адаптивность сортов озимой пшеницы в условиях юго-востока Западной Сибири. Вестник АГАУ. 2015; 6: 5–8.
2. Ефимов В.Н. Система удобрений. М.: Колос; 2002. 32.
3. Менликеев М.Я., Смирнов В.В., Байгузина Ф.А. Фитоспорин – биологический препарат для защиты растений от болезней. Уфа; 1991: 21–23.
4. Чулкина В.А. Управление агроэкосистемами в защите растений. Новосибирск; 1995. 201.
5. Гилязетдинов Ш.Я., Нугуманов А.Х., Пусенкова Л.И. Эффективность антистрессовых препаратов и биофунгицидов в системе защиты сельскохозяйственных культур от неблагоприятных абиотических и биотических факторов. Уфа; 2008. 372.
6. Терехина Л.Д., Терехин Д.А. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как стимулирующий агент развития ювенильных растений INVITRO. Материалы 12-й Международной пушинской конференции. 11–15 мая 2008 г. Пушкино; 2008: 229–230.
7. Юдина Т.Т., Бурцева Л.И. Действие эндотоксинов четырех подвидов *Bacillus thuringiensis* на различных прокариот. Микробиология. 1997; 1: 25–31.
8. Каменек Л.К., Климентова Е.Г. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении фитопатогенных грибов родов *Phytophthora* и *Fusarium*. Биотехнология. 2005; 1: 76–83.
9. Cooksey K.E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of *Lepidoptera*. *Biochem. J.* 1968; 106: 445–454.
10. Каменек Л.К. Выделение и очистка кристаллов эндотоксина *Bacillus thuringiensis*. Бюл. научно-техн. информации. 1981; 2: 14–15.
11. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат; 1988: 111–112.
12. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат; 1985: 193–196.
13. Кузнецов В.В. Физиология растений. М.: Высшая школа; 2006: 742–743.
14. Рубин Б.А. Физиология сельскохозяйственных растений. М.; 1967: 496–497.
15. Каменек Л.К., Терехина Л.Д., Каменек В.М. Изучение ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина на примере растений огурца. Вестник НГАУ. 2010; 4: 13–18.

## GROWTH-STIMULATING EFFECT OF DELTA-ENDOTOXIN *BACILLUS THURINGIENSIS* ON WHEAT DURING JUVENILE PHASE

Ya.A. Korobov, L.K. Kamenek, V.M. Kamenek, L.F. Useeva

*Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia*

e-mail: jkoro@bk.ru

*The objective of the study is to examine the growth-stimulating effect of Delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis* on soft spring wheat *Altaiskaya 105*.*

*Materials and Methods. Strain 202 B. *thuringiensis* ssp. *thuringiensis* was used in the work. The seeds of the soft spring wheat *Altaiskaya 105*, producer “*Zhivye produkty Altaya / Life Products of Altay*” were used during the study.*

*Results. Evaluation of various concentrations of delta-endotoxin solution on germination energy and laboratory germination showed that the most optimal and effective for presowing soaking is a concentration of 0.6 %. The authors revealed the stimulating effect of Delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*, leading to an increase in biometric and biochemical parameters of juvenile soft wheat germs. Heteroauxin and ascorbic acid synthesis increased in the tissues of wheat germs. The obtained effects can be due to direct delta-endotoxin stimulating effect on the plants or they can be caused by general plant improvement.*

**Keywords:** *Delta-endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, heteroauxin, ascorbic acid, growth-stimulating effect, germination, Salkowski reagent, Giroux reagent.*

**References**

1. Melekina T.S., Pinchuk L.G. Urozhaynost' i adaptivnost' sortov ozimoy pshenitsy v usloviyakh yugovostoka Zapadnoy Sibiri [Yielding capacity and adaptability of winter wheat varieties under the conditions of the South-East of West Siberia]. *Vestnik AGAU*. 2015; 6: 5–8 (in Russian).
2. Efimov V.N. *Sistema udobreniy* [Fertilizer system]. Moscow: Kolos; 2002. 32 (in Russian).
3. Menlikeev M.Ya., Smirnov V.V., Bayguzina F.A. *Fitosporin – biologicheskiy preparat dlya zashchity rasteniy ot bolezney* [Fitosporin – a biological preparation for plant diseaseless management]. Ufa; 1991: 21–23 (in Russian).
4. Chulkina V.A. *Upravlenie agroekosistemami v zashchite rasteniy* [Agroecosystem management in plant protection]. Novosibirsk; 1995. 201 (in Russian).
5. Gilyazetdinov Sh.Ya., Nugumanov A.Kh., Pusenkova L.I. *Effektivnost' preparatov i biofungitsidov v sisteme zashchity sel'skokhozyaystvennykh rasteniy ot neblagopriyatnykh abioticheskikh i bioticheskikh faktorov* [Preparation and biofungicide efficacy in protection of agricultural plants from negative abiotic and biotic factors]. Ufa; 2008. 372 (in Russian).
6. Terekhina L.D., Terehin D.A. Del'ta-endotoksin *Bacillus thuringiensis* kak stimulyuyushchiy agent razvitiya yuvenil'nykh rasteniy INVITRO [Delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis* as a stimulative agent for juvenile plant growing INVITRO]. *Materialy 12-y Mezhdunarodnoy pushchinskoy konferentsii* [Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Pushchino conference]. 2008 May 11–15. Pushchino; 2008: 229–230 (in Russian).
7. Yudina T.T., Burtseva L.I. Deystvie endotoksinov chetyrekh podvidov *Bacillus thuringiensis* na razlichnykh prokariot [Effect of endotoxin *Bacillus thuringiensis* (4 subtypes) on different prokaryotes]. *Mikrobiologiya*. 1997; 1: 25–31 (in Russian).
8. Kamenek L.K., Klimentova E.G. Deystvie del'ta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* v otnoshenii fitopatogennykh gribov rodov *Phytophthora* i *Fusarium* [Effect of delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*, particularly phytopathogenic mushrooms *Phytophthora* and *Fusarium*]. *Biotekhnologiya*. 2005; 1: 76–83 (in Russian).
9. Cooksey K.E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of Lepidoptera. *Biochem. J.* 1968; 106: 445–454.
10. Kamenek L.K. Vydelenie i ochistka kristallov *Bacillus thuringiensis* [Extraction and purification of crystals of endotoxin *Bacillus thuringiensis*]. *Byul. nauchno-tekhn. informatsii*. 1981; 2: 14–15 (in Russian).
11. Pausheva Z.P. *Praktikum po tsitologii rasteniy* [Manual on plant cytology]. Moscow: Agropromizdat; 1988: 111–112 (in Russian).
12. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methodology of field experiment]. Moscow: Agropromizdat; 1985: 193–196 (in Russian).
13. Kuznetsov V.V. *Fiziologiya rasteniy* [Plant physiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 2006: 742–743 (in Russian).
14. Rubin B.A. *Fiziologiya sel'skokhozyaystvennykh rasteniy* [Agricultural plants physiology]. Moscow; 1967. 496–497 (in Russian).
15. Kamenek L.K., Terekhina L.D., Kamenek V.M. Izuchenie rostostimulyuyushchego deystviya del'ta-endotoksina na primere rasteniy ogurtsa [Study of delta-endotoxin growth-stimulating effect as illustrated by cucumber]. *Vestnik NGAU*. 2010; 4: 13–18 (in Russian).