

СТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ САЛАТА

А. В. Крыжко, Л. Н. Кузнецова

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Поступила в редакцию 16.02.2016 г.

Аннотация. Изучен стимулирующий эффект энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* 787, 926, 0293, Z-52 на растения салата сорта Одесский кучерявец при проращивании семян и при культивировании растений от стадии 10-дневного проростка до стадии шестого листа. Показано, что штаммы 787, 926, Z-52 при проращивании семян оказывают незначительный ингибирующий эффект на развитие растений. Однако, при внесении культур таких штаммов в питательную смесь на стадии 10-дневного проростка, наблюдается стимуляция роста растений. Культуры штаммов способствуют увеличению надземной части растений салата в среднем на 24.5%, удлинению корней на 7.2%, увеличению веса растений на 83.8%. В среднем на 47.2% увеличивался объем корней и на 67.0% площадь листьев. Отмечено также увеличение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней салата в среднем на 116.5 и 61.3% к контролю. Штамм *B. thuringiensis* 0293 ростстимулирующего эффекта на растения салата не оказывает.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, салат, морфометрические показатели, адсорбирующая поверхность корней, стимуляция роста растений

Abstract. The stimulatory effect of entomopathogenic *B. thuringiensis* 787, 926, 0293, Z-52 strains on cutting lettuce plants of Odessky kucheryavets variety during seed germination and plant cultivation from the stage 10-day seedling until the sixth leaf stage being discussed. Studies of the strains 787, 926, Z-52, effect on the seed germination indicate that *B. thuringiensis* have little inhibitory effect on plant development. However, adding such strains cultures to nutrient mixture, in the experiment with 10 days old seedling, showed the stimulation of plant growth. The strains culture helps to increase the above-ground parts of the plant lettuce on average by 24.5%, root elongation of 7.2%. It increases a plant weight by 83.8%. The volume of roots increases by 47.2% and the leaf area - by 67.0%. It should be noted that the total and the working surface of the absorbent roots of cutting lettuce increases by 116.5 and 61.3% to control. The *B. thuringiensis* 0293 strain doesn't have a growth-stimulating effect on lettuce plants.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, salad, morphometric parameters, adsorbing root surface, plant growth stimulation

Повышенные требования, предъявляемые как к качеству, так и к хранению сельскохозяйственной продукции обуславливают возрастающий интерес к углубленному исследованию свойств бактерий - продуцентов биологически активных веществ. Одним из актуальных направлений может стать поиск продуцентов биопрепаратов с ярко выраженными комплексными свойствами (энтомоцидными, ростстимулирующими, стресспротекторными). Подобные исследования будут

способствовать разрешению проблем не только получения экологически безопасного агропродукта, но и повышению экологической устойчивости агроэкосистем.

Перспективным в этом плане является углубленное изучение свойств бактерий *Bacillus thuringiensis*, известных как высокоэффективные энтомопатогены, широко использующиеся в качестве основы целого ряда биопрепаратов для защиты растений от вредителей. Такие препараты можно применять в любую фазу вегетации, как на вегетативных, так и на генеративных органах растений.

Особенностью бактерий *B. thuringiensis* является способность к продуцированию белкового термолабильного δ -эндотоксина, который, помимо энтомопатогенного действия [1], влияет на показатели роста и развития сельскохозяйственных культур [2, 3]. Однако исследования в этом направлении представлены единичными публикациями и, таким образом, данный вопрос требует более углубленного изучения.

Целью данных исследований являлось изучение стимулирующего эффекта штаммов *B. thuringiensis* на морфометрические и отдельные физиологические показатели (общую и рабочую адсорбирующую поверхность корней) растений салата.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Работа проводилась на базе Отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма. Материалом для работ служили споровые культуры энтомопатогенных бактерий штаммов *B. thuringiensis* 787, 926 и 0293. Данные штаммы выделены из насекомых природных популяций в лаборатории физиологии и экологии микроорганизмов Отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН НИИСХ Крыма. Штаммы относятся к разным серотипам, не продуцируют β -экзотоксин: шт. *B. thuringiensis* var. *shandongiensis* 787 – к 22 серотипу, штамм *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 926 – к 3 серотипу и *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 – к 3 серотипу. Действие штаммов сравнивалось с действием штамма *B. thuringiensis* var. *kurstaki* Z-52, для которого наличие ростстимулирующих свойств показано рядом исследований [4, 5].

Исследования проводили в лабораторном и вегетационном опытах (водная культура) на растениях салата сорта Одесский кучерявец. Семена, используемые в опытах, поверхностно стерилизовали в 0,5% растворе $KMnO_4$ (15 мин.) с последующим многократным промыванием стерильной водой. Промытые семена раскладывали в чашки Петри на увлажненную стерильную фильтровальную бумагу и выдерживали при 5°C в течение 4 суток [6].

В последующем, при постановке лабораторных опытов, в чашки с семенами добавляли смыв споровой культуры исследуемых штаммов с титром спор 3,5 млрд./мл из расчета 1 мл смыва на 9 мл стерильной воды, в контрольные чашки – 10 мл стерильной дистиллированной воды. Затем чашки помещали в термостат при 20°C на 6 суток.

Определение влияния штаммов *B. thuringiensis* 787, 926, 0293 и Z-52 на морфометрические показатели проростков салата (длину стебля и корня, вес проростка) проводили в сроки, установленные согласно ГОСТ 123038-84 [6] согласно методике М. Дука [7].

В качестве питательного раствора для водной культуры использовали смесь Цинцадзе со стабильной реакцией pH 7.3 [8]. В опытах измеряли вегетационные сосуды объемом 0.5 л, куда к смеси Цинцадзе добавляли смыв культур со скошенного агара (титр 3.5 млрд. спор /мл. из расчета 50 мл смыва на 0.5 л смеси). Аэрацию водной культуры проводили с помощью компрессора 15 мин./сутки. В данных условиях растения культивировали 14 дней, в дальнейшем, каждые 14 суток, питательный раствор заменяли свежей смесью Цинцадзе. В качестве контроля использовали питательные растворы, где к смеси Цинцадзе вместо бактериальной культуры добавляли эквивалентный объем воды.

Для оценки биоморфометрических показателей роста салата, исследовали растения на стадии шестого листа. Такие растения снимали с вегетационных сосудов, корни обсушивали фильтровальной бумагой и проводили следующие измерения: устанавливали общую сырую массу растения и, отдельно, сырую массу надземной части и сырую массу корня. Также измеряли общую длину растения от кончика корня до кончика верхнего листа, длину надземной части растения (от корневой шейки до кончика верхнего листа), длину корневой системы (от корневой шейки до кончика самого длинного корня) [7].

Изучение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней растений салата проводили по Д.А. Сабину и И.И. Колосову [9].

Достоверность различий между опытными и контрольными вариантами оценивали по критерию Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В опытах с обработкой семян, результаты исследования показали, что штаммы *B. thuringiensis* 787, 0293 не оказывают значимого влияния на морфометрические показатели 10-дневных проростков салата (длину стебля и корня) как по сравнению с эталонным штаммом *B. thuringiensis* Z-52, так и с контролем (табл.1). Исключением являлся вариант со штаммом 926, под действием которого наблюдали укорачивание стеблей на 11.0% по сравнению со штаммом Z-52 и на 16.2% к контролю.

При обработке семян штаммами *B. thuringiensis* во всех опытных вариантах наблюдали несущественное уменьшение веса проростков салата соответственно на 8.9; 9.1; 8.7 и 7.2% к контролю.

Таким образом, бактерии штаммов *B. thuringiensis* 787, 0293 и 926 при обработке семян салата не проявляют ростстимулирующий эффект на развитие стебля и корней проростков.

Исследования были продолжены на растениях салата, выращенных в водной культуре до стадии шестого листа.

Установлено, что штаммы *B. thuringiensis* 787 и 926, при внесении в питательную смесь, способствуют выраженному увеличению биоморфометрических показателей растений (рис.1). Так, увеличение общей длины растений по сравнению с контролем отмечено на 14.9%, длины надземной части - на 21.9 и 21.9%, длины корня - на 10.9 и 4.1% соответственно. Полученные данные сравнимы с соответствующими данными, полученными при внесении в питательный раствор эталонного штамма Z-52.

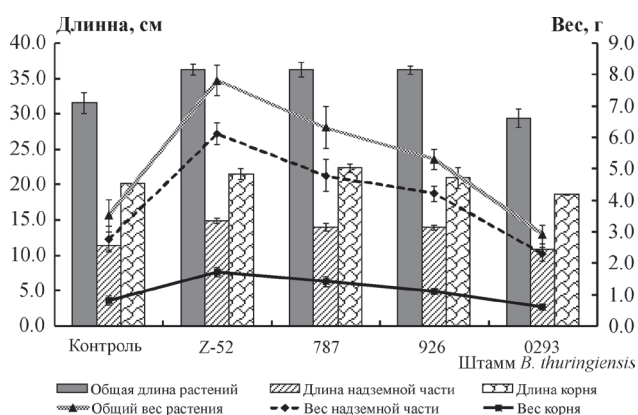


Рис. 1. Влияние штаммов *B. thuringiensis* на биоморфометрические показатели растений салата Одесский кучерявец.

При обработке растений штаммом *B. thuringiensis* 0293 существенного влияния на показатели роста растений как в сравнении с контролем, так и в сравнении с эталонным штаммом не отмечено.

Стимулирующий эффект штаммов 787 и 962 на биометрические показатели растений салата отражался как на суммарном весе растений, так и на весе надземной части и корня. Установлено, что под действием таких штаммов, по сравнению с контролем, вес растений увеличивался соответственно на 77.1 и 51.4%, вес надземной части - на 77.7 и 55.5%, а вес корня - на 75.0 и 37.5% соответственно. Однако, полученные данные, хотя и не значительно, но всё же уступали данным, полученным в варианте с эталонным штаммом Z-52.

Таким образом, культуры штаммов *B. thuringiensis* 787 и 926 при внесении в питательную смесь в 10-дневном возрасте растений салата, в отличие от внесения культур на стадии проращивания семян, способствуют стимуляции роста надземной части и корневой системы, что приводит к увеличению общего веса растений.

В ходе исследований удалось установить так же, что под действием штаммов 787 и 926, по сравнению с контролем, увеличивалась и площадь листового аппарата салата (на 73.6 и 58.5% соответственно), в то время как обработка растений штаммом 0293 способствовала уменьшению площади листового аппарата на 29.9% к контролю (рис. 2). Влияние штаммов 787 и 962 в данных исследованиях находилось на уровне влияния эталонного штамма Z-52.

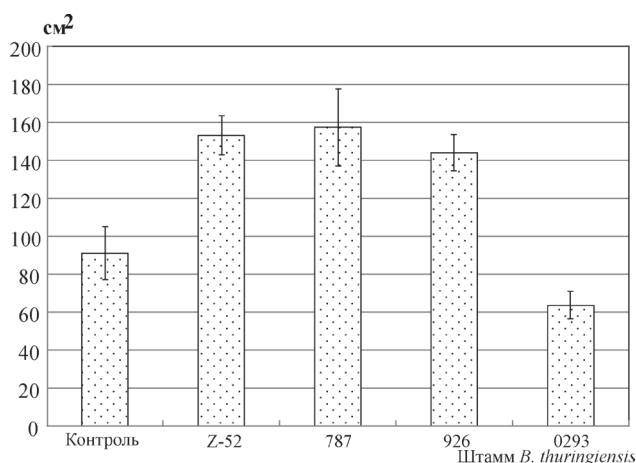


Рис. 2. Влияние штаммов *B. thuringiensis* на площадь листового аппарата растений салата сорта Одесский кучерявец.

Таблица 1

Влияние штаммов *B. thuringiensis* на морфометрические показатели 10-дневных проростков при обработке семян салата сорта Одесский кучерявец

Вариант опыта (шт. <i>B. thuringiensis</i>)	Длина стебля, см	Длина корня, см	Вес проростка, мг
Контроль (вода)	2.41 ± 0.04	3.87±0.14	14.80±0.36
Z-52 (эталон)	2.27 ± 0.06	3.64±0.12	13.48±0.37
787	2.28 ± 0.05	3.68±0.13	13.45±0.35
0293	2.32 ± 0.06	4.07±0.16	13.51±0.42
926	2.02 ± 0.06	3.73±0.14	13.74±0.35

Развитие растений напрямую зависит от особенностей его минерального питания, а именно от способности растения поглощать питательные вещества. Известно, что первым этапом поглощения веществ корнями является полярная адсорбция ионов на поверхности растений. Поэтому, дальнейшие исследования были посвящены изучению влияния штаммов *B. thuringiensis* 787, 926, 0293 и Z-52 на общую и рабочую адсорбирующую поверхность корней растений салата.

Установлено, что внесение штаммов 787 и 926 в питательную смесь способствует увеличению общей адсорбирующей поверхности корней соответственно на 108.2 и 96.4% к контролю (рис.3). Однако, по сравнению с эталонным штаммом Z-52, отмеченный эффект был несколько меньше: в варианте со штаммом 787 общая адсорбирующая поверхность снижалась на 15.1%, а штаммом 926 - на 19.8%.

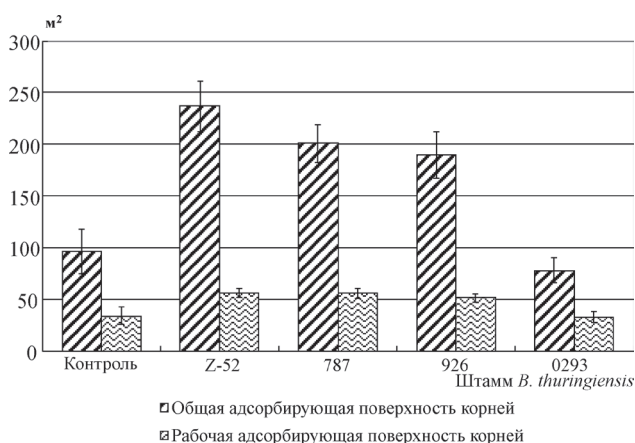


Рис. 3. Влияние штаммов *B. thuringiensis* на общую и рабочую адсорбирующую поверхность корня растений салата сорта Одесский кучерявец.

Результаты влияния бактерий штаммов 787 и 926 на рабочую адсорбирующую поверхность корней салата свидетельствуют об её увеличении соответственно на 65.7 и 52.4% к контролю. Полученные значения были на уровне эталонного штамма Z-52.

Обогащение питательного раствора бактериями штамма *B. thuringiensis* 0293 напротив, способствовало снижению общей адсорбирующей поверхности корней салата на 19.3% и незначительному снижению рабочей адсорбирующей поверхности корней на 2.9 % по сравнению с контролем.

Анализируя полученные результаты можно отметить, что штаммы *B. thuringiensis* 787 и 926 стимулируют увеличение как общей, так и рабочей адсорбирующей поверхности корней салата, что свидетельствует о стимулирующем влиянии

штаммов на перемещение адсорбированных ионов внутрь корня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, энтомопатогенные штаммы *B. thuringiensis* 787 и 926, при внесении в питательную среду при выращивании салата сорта Одесский кучерявец, способствуют стимуляции роста и развития растений, что проявляется в увеличении биоморфометрических показателей, определяющих увеличение общей массы растений. Полученные результаты подтверждают перспективы использования бактерий *B. thuringiensis* в качестве компонентов комплексных биоудобрений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика / Н.В. Кандыбин. — Всесоюз. акад. с.-х. наук им. В.И.Ленина. М.: Агропромиздат, 1989. — 172 с.
2. Bandopadhyay S. Isolation and characterization of plant growth promoting *Bacillus thuringiensis* from agricultural soil of West Bengal / S. Bandopadhyay, S. Pal, S.R. Gangopadhyay // Res. J. Biotechnol. — 2011. — Vol. 6, №2 — P. 9–13.
3. Makonde H.M. Effects of *Bacillus thuringiensis* CRY1A(c) d-endotoxin on growth, nodulation and productivity of beans [*Phaseolus vulgaris* (L.) and siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.)] / H.M. Makonde [et al.] // African Journal of Biotechnology. — 2010. — Vol. 9, № 1 — P. 017– 024.
4. Симонова А.А. Стимулирующее действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* kurstaki штамм Z -52 на ювенильные растения/ А.А. Симонова [и др.] // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы», 15-16 сентября 2008 г. — Казань, 2008. — С. 119 – 120.
5. Терехин Д.А. Характер действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* kurstaki штамм Z -52 на огурец в условиях низких температур in vitro/ Д.А. Терехин [и др.] // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы», 15-16 сентября 2008 г. — Казань, 2008. — С.131 – 132.
6. ГОСТ 123038–84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. — М.: Госстандарт, 1991. — С. 44–92.
7. Практикум по агрохимии: учебное пособие./ Под ред. академика РАСХН В.Г. Минеева. — М.: Изд-во МГУ, 2001. — 689 с.

8. Дука М. Физиология растений: практикум для студентов биолого-почвенного факультета / М.Дука, Т. Хоменко, Е. Савка. — Молдавский гос. ун-т., Каф. биологии растений. — Кишинэу: Central Editorial al USM, 2003. — 134с.

9. Біохімія рослин. Малий практикум. / О.О. Авксентьева, Л.О. Красильникова, В.В. Жмурко — Х.: ХНУ імені В.Н. Карабіна, 2006. — 68с.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Крыжко А. В., кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и экологии микроорганизмов

Тел.: +7 879 781-92-48

E-mail: solanum@ukr.net

*Research Institute for Agriculture of Crimea
Kryzhko A. V., Ph.D., Senior Scientific
Researcher of Microorganisms physiology and
ecology laboratory*

Ph.: +7 879 781-92-48

E-mail: solanum@ukr.net

Кузнецова Л. Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и экологии микроорганизмов

Тел.: +7 879 717-29-32

E-mail: kyz_lydmila@mail.ru

*Kuznetsova L. N., Ph.D., Leading Scientific
Researcher of Microorganisms physiology and
ecology laboratory,*

Ph.: +7 879 717-29-32

E-mail: kyz_lydmila@mail.ru