

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* КАК БИОРЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ С ФИТОЗАЩИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ PERSPECTIVES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* DELTA-ENDOTOXIN USAGE AS A PLANT GROWTH BIOREGULATOR WITH PHYTOPROTECTIVE FEATURES

Е.Г. Климентова, Л.К. Каменек, Д.В. Каменек, А.А. Купцова, М.А. Терпиловский, Ульяновский государственный университет, 432700, Россия, Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42, тел.: (8422) 32-84-45, e-mail: kameneklk@mail.ru

О.Л. Янишевская, РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, 49, тел.: (495) 976-29-71, e-mail okyan@list.ru

E.G. Klimentova, L.K. Kamenek, D.V. Kamenek, A.A. Kuptsova, M.A. Terpilovsky, Ul'yanovsk State University, 432700, Russian Federation, Ul'yanovsk, L. Tolstoy st., 42, tel.: (8422) 32-84-45, e-mail: kameneklk@mail.ru

O.L. Yanishevskaya, Russian State Agrarian University — MTAА named after K.A. Timiryazev, 127550, Russian Federation, Moscow, Timiryazevskaya st., 49, tel.: (495) 976-29-71, e-mail okyan@list.ru

В полевых условиях установлено положительное влияние дельта-эндотоксина, продуцируемого бактерией *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, на всхожесть семян, укоренение рассады, рост, развитие, динамику формирования кочанов и продуктивность капусты белокочанной, а также на устойчивость проростков растений к черной корневой гнили.

Ключевые слова: дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*, ростстимулирующий и фитозащитный эффект, капуста белокочанная.

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* delta-endotoxin preparation stimulated the formation of roots; growth and development performance of cabbage-heads and crop capacity of white cabbage, reduced the damage caused by black root rot of cabbage disease.

Key words: *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, growth stimulating and phytoprotective effect, white cabbage.

Интенсификация производства сельскохозяйственной продукции в настоящее время связана с необходимостью повышения экологической устойчивости агроэкосистем и адаптационной устойчивости растений к болезням, вредителям и другим неблагоприятным факторам окружающей среды.

Осуществление реализации максимальной продуктивности растений при повышении их устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам может быть достигнуто при использовании биологических регуляторов роста растений, которые интенсифицируют физиолого-биохимические процессы в растениях и одновременно повышают их устойчивость к стрессам и болезням.

В работах, посвященных проблемам иммунитета растений, показано, что применяемые ныне биопрепараты на основе продуктов жизнедеятельности низших грибов, актиномицетов и бактерий, такие как фитобактериомицин, трихотетин, биомицин не только снижают поражаемость растений патогенами, но и стимулируют процессы роста и развития, усиливают ферментативную активность тканей, способствуют большому накоплению сухих веществ и растворимых сахаров [2].

В настоящее время в России используют более 80 регуляторов роста растений на основе 33 действующих веществ. Высокая биологическая активность регуляторов роста растений проявляется в низких концентрациях, и, как правило, они не оказывают вредного влияния на почву и окружающую среду. Входящие в эту группу соединений антибиотики, фитогормоны или их аналоги повышают продуктивность растений и улучшают качество продукции.

Эти биопрепараты можно применять в любую фазу вегетации растений как на вегетативных, так и на генеративных органах, не вызывая их повреждений и не изменяя качества продуктов урожая.

Перспективными защитными препаратами биологического происхождения могут быть бактериальные токсины. Одним из них является дельта-эндотоксин почвенной бактерии *B. thuringiensis*. При искусственном применении он безвреден для теплокровных животных, полезных насекомых и почвенной фауны, так как достаточно быстро (в течение 3—4 недель) разрушается в природных условиях.

В последнее время установлена бактериальная и фунгицидная активность дельта-эндотоксина в отношении ряда бактерий родов *Micrococcus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и грибов родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris* [5, 6, 9].

Целью нашей работы было установить действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на рост, развитие, устойчивость к болезням и биохимические показатели растений белокочанной капусты в различные периоды онтогенеза.

В качестве продуцента дельта-эндотоксина использовали культуру *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (штамм Z-52) из коллекции Государственного НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва). Бациллу культивировали в термостатах при температуре 27°C в чашках Петри на агаризованной питательной среде №14. Токсин выделяли после разделения спор и кристаллов в двухфазной системе: водный раствор Na_2SO_4 — хлороформ [11], при этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию проводили по методу Кукса [10]. Доочистку эндотоксина осуществляли микрофильтрацией (диаметр пор фильтра 0,4 мкм). Во всех экспериментах использовали свежеприготовленные растворы кристаллов. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Двухлетние полевые испытания проводили на землях агробиостанции Ульяновского государственного педагогического университета. Почва опытного участка: лугово-черноземная среднегумусная среднеспособная легкоглинистая, pH 6,9, содержание гумуса 7,2%, содержание обменного Ca^{+2} — 41,2, обменного Mg^{+2} — 6,4 мг-экв. на 100 г почвы, гидролитическая кислотность — 2,9 мг-экв., степень насыщенности почвы основаниями — 94%.

В работе использовали семена среднеспелой капусты белокочанной сорта Слава 1305 селекции Всероссийского НИИ селекции и семеноводства овощных культур. Рассаду белокочанной капусты возраста 35 дней высаживали в поле во второй декаде мая по схеме 50×70 см, по 200 растений на каждой делянке. Учетные делянки размещали рендомизированно, повторность опытов была 3-кратной. Изучение действия бета-эндотоксина проводили при соблюдении общепринятой технологии и агротехники выращивания белокочанной капусты в Ульяновской области. Контроль — семена и растения обрабатывали водой. В опыте семена и вегетирующие растения обрабатывали растворами дельта-эндотоксина.

Все биохимические анализы по определению содержания сахаров, хлорофилла, каротиноидов, нитратов выполнены в трехкратной повторности по общепринятым методикам [3]. Содержание сухого вещества вегетативной массы рассчитывали в процентах от веса свежей

Таблица 1. Влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на приживаемость и поражаемость рассады белокачанной капусты черной корневой гнилью и на биометрические показатели растений (средние за 2 года)*

Варианты опыта	Приживаемость рассады, %	Пораженность рассады черной корневой гнилью, %	Число листьев, шт	Завязываемость кочанов, %	Отношение массы кочана к общей массе растения, %
Контроль	85,7±4,5	26,3±4,8	12,0±1,1	77,8±4,5	54,0±4,7
Токсин 0,5 мг/мл	95,0±3,3	9,0±2,5	14,9±1,3	96,1±5,1	69,4±5,2
Токсин 0,75 мг/мл	96,2±2,8	8,7±2,2	15,2±1,0	97,8±5,5	71,1±6,3
Токсин 1,5 мг/мл	94,9±2,9	6,1±1,9	14,5±1,5	93,0±6,0	67,3±4,9
НСР _{0,5}	7,5	5,5	1,2	8,0	10,3

* Учет приживаемости рассады проводился на 7-й день после ее высадки в поле, а количество листьев — через 7 дней после опрыскивания капусты в начале фазы образования кочана.

зеленой массы растений, высушенной до постоянного веса при 105°С.

Диагностику заболеваемости рассады капусты черной корневой гнилью проводили согласно общепринятым рекомендациям по фитопатологической оценке [7].

Все результаты обрабатывали статистически, рассчитывая величину наименьшей существенной разности (НСР) с учетом соответствующего уровня значимости.

В результате проведенных исследований установлено, что обработка семян и вегетирующих растений раствором дельта-эндотоксина оказывает положительное влияние на рост, развитие, динамику формирования кочанов и продуктивность белокачанной капусты.

Наиболее существенное влияние на развитие растений оказала комплексная обработка дельта-эндотоксином в концентрации 0,75 мг / мл семян и вегетирующих растений в послерассадный период в фазах 6—7, 10—12 листьев и в начале образования кочана. При этом основные фазы наступали раньше: отмечалось ускорение появления всходов на 1—2 дня, образование 3—5 листьев — на 1—3 дня, 6—7 листьев — на 2—4 дня, 10—12 листьев — на 1—5 дней, кочанов — на 5—10 дней, наступления технической и товарной спелости — на 3—7 дней.

При обработке дельта-эндотоксином в концентрации 0,75 мг / мл приживаемость рассады составила в среднем 96,2% по сравнению с 85,7% в контрольном варианте. Также наблюдалось существенное увеличение числа листьев (15,2 по сравнению с 12 в контроле), количества завязавшихся кочанов (97,8% по сравнению с 77,8% в контроле) и соотношения массы кочана к общей массе растения (71,1% по сравнению с 54% в контроле) (табл. 1).

Обработка семян и растений капусты дельта-эндотоксином привела к снижению поражаемости рассады черной корневой гнилью, вызываемой фитопатогенным грибом *Rhizoctonia solani* J.G. Kuehn, на естественном фоне развития заболевания, что способствовало получению более качественной рассады.

Наиболее эффективное фитозащитное действие проявлялось при обработке растений токсином в концентрации 1,5 мг / мл. В этом случае число растений, пораженных заболеванием, составило 6,1% по сравнению 26,3% в контрольном варианте. Фитозащитный эффект дельта-эндотоксина меньших концентраций оказался несколько ниже и составил в среднем от 8,7 до 9,0 % пораженных растений.

Фунгистатическое действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на ряд фитопатогенных грибов, в том числе и на *R. solani*, отмечалось в работах ряда авторов [4,

8]. Был выявлен эффект подавления линейного роста мицелия микромицетов токсином в различных концентрациях на 75—100%, замедление формирования ростовой трубки у спор грибов на 1—1,5 часа, снижение количества проросших спор на 47%. Была показана стимуляция токсином всхожести семян злаковых и овощных культур, а также его ростстимулирующее и иммуноиндуцирующее действие на ювенильные растения яровой пшеницы и озимой ржи.

Можно полагать, что установленный эффект стимулирования всхожести семян, роста и развития растений, индуцирования более интенсивного формирования кочанов, увеличения соотношения массы кочана к общей массе растений под влиянием обработки семян и вегетирующих растений раствором дельта-эндотоксина связан с более активным образованием хлорофилла и каротиноидов в листьях растений, что способствует увеличению интенсивности фотосинтеза и, как следствие, более интенсивному накоплению в листьях капусты сахаров и сухих веществ (табл. 2).

Наибольший эффект наблюдался при обработке семян и растений раствором дельта-эндотоксина в концентрации 0,75 мг / мл. При этом количество хлорофилла в листьях растений увеличилось на 6,8%, каротиноидов — на 4,3%, сухих веществ на 0,7%, а сахаров — на 0,8% по сравнению с контрольным вариантом.

Таблица 2. Влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на биохимические показатели белокачанной капусты (средние за 2 года). ПДК NO₃ = 500 мг / кг

Варианты опыта	Сухие вещества, %	N-NO ₃ , мг / кг	Сахара, %	Хлорофилл, мг %	Каротиноиды, мг %
Контроль	7,3±1,1	206,5±18,0	2,3±0,2	70,7±6,7	13,6±2,9
Токсин 0,5 мг/мл	7,9±0,8	180,4±21,7	2,8±0,3	75,2±5,4	17,4±3,7
Токсин 0,75 мг/мл	8,0±1,2	176,7±16,8	3,1±0,4	77,5±6,5	17,9±4,2
Токсин 1,5 мг/мл	7,7±1,4	179,8±12,6	2,7±0,3	76,4±5,6	16,8±4,5
НСР _{0,5}	0,3	15,4	0,2	4,8	3,1

Кроме того, при применении дельта-эндотоксина наблюдалось снижение накопления в листьях капусты нитратного азота в среднем до 176,7—180,4 мг / кг по сравнению с 206,5 мг / кг в контроле, что объясняется, видимо, наиболее полным усвоением потребляемых растениями соединений азота вследствие более интенсивного протекания биосинтетических процессов, приводящих к ускорению роста, индуцированию образования и формирования кочана и увеличению его массы.

Таким образом, обработка семян, рассады и вегетирующих растений растворами дельта-эндотоксина оказывает положительное влияние на рост, развитие, динамику формирования кочанов и продуктивность белокачанной капусты, приводит к снижению поражаемости рассады черной корневой гнилью, что способствует получению более качественной рассады. Повышение содержания сахаров и снижение накопления нитратного азота улучшает качество конечной продукции, улучшает лежкость кочанов при хранении.

В связи с этим использование выделенных и очищенных дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* для создания новых биопрепаратов с иммуно- и ростстимулирующим действием для растений представляет большой практический интерес. ■

Литература

1. Егоров Н.С., Юдина Т.Г., Баранов А.Ю. О корреляции между инсектицидной и антибиотической активностями параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 1990. — Т. 59. — № 3. — С. 448—452.
 2. Дорожкин Н.А., Бельская С.И., Волуевич Е.А. и др. Проблемы иммунитета сельскохозяйственных растений к болезням. — Мн.: Наука и техника. 1988. — 248 с.

3. Ермаков А.И., Арасимович В.Е., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат. Ленинградское отделение, 1978.
4. Каменек Л.К., Тюльпинаева А.А., Климентова Е.Г., Демидова О.А. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как агент биологического контроля растений // Тезисы V Пущинской конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века», Пущино, 16—20 апреля 2001. — Пущино, 2001. — С. 237.
5. Каменек Л.К., Левина Т.А., Пантелеев С. В., Терехин Д.А, Миначева Л.Д. Об устойчивости растений овса к бурому бактериозу под влиянием дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* // Сельскохозяйственная биология. 2006. — № 1. — С. 98—106.
6. Климентова Е.Г. Антимикробное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении ряда фитопатогенных бактерий. Автореф. канд. дис. — М., 2001.
7. Пересыпкин В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. / 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1989. — 480 с.
8. Тюльпинаева А.А., Климентова Е.Г. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как экологически безопасного агента на фитопатогенные грибы // Сб. материалов IV республиканской конференции по актуальным экологическим проблемам республики Татарстан. — Казань, 2000. — С. 182.
9. Юдина Т.Г., Милько Е.С., Егоров Н.С. Чувствительность диссоциантов *Micrococcus luteus* к действию δ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 1996. — Т. 65. — № 3. — С 365—369.
10. Cooksey K. E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to a larvae of *Lepidoptera* // Biochem. J. — 1968. — V.106. — P.445—454.
11. Pendleton I. R., Morrison R.B. Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. Nature, 1966, V.212, pp.228—729.