



Биолог. журн. Армении, 3 (60), 2008

РОСТ И РАЗВИТИЕ НЕКОТОРЫХ БОБОВЫХ КУЛЬТУР ПРИ ОБРАБОТКЕ БАКТЕРИАЛЬНЫМ МЕЛАНИНОМ

К.Г. АЗАРЯН¹, А.С. ОВСЕПЯН², Д.А. ЗАПРОСЯН¹

¹Ереванский государственный университет, биологический факультет,
кафедра микробиологии и биотехнологии, E-mail: physiol@ysu.am

²ЗАО "НИИ Биотехнология"

Изучено влияние бактериального меланина (*Btm*) на рост, структуру стебля и плодообразование при предпосевном замачивании семян некоторых бобовых культур. Установлено стимулирующее влияние *Btm* на прорастание семян, рост, ветвление сеянцев и плодообразование испытанных культур. При этом у многих видов усиливается меристематическая активность и повышается содержание хлорофилла *a*.

Бобовые культуры - бактериальный меланин - повышение урожайности – фитостимуляторы

Ուսումնասիրվել է բակտերիալ մելանինի (*Btm*) ազդեցությունը լոբու, սիսեռի, ոլոռի, ոսպի և առվույտի աճման և զարգացման վրա սերմերի նախացանքային թրջման դեպքում: Հաստատվել է *Btm*-ի խթանիչ ազդեցությունը սերմերի ծլման, ծիլերի աճման, ցողունի ճյուղավորման, ծաղկման և պտղառաջացման վրա: Ցույց է տրված *Btm*-ի խթանիչ ազդեցությունը մերիստեմատիկ հյուսվածքների ակտիվության և քլորոֆիլ *a*-ի սինթեզի վրա:

Լոբազգիներ -- բակտերիալ մելանին – բերքատվության բարձրացում -ֆիտոստիմուլանտներ

The influence of bacterial melanian (*Btm*) on been, alfalfa, pea, chik-pea, lentil seeds was studied. The stimulate action of *Btm* on seed germination, seedlings growth, branching, blossoming and fruitification was established. The stimulate action of *Btm* also on activation of meristematic tissues and chlorophyll *a* synthesis was shown.

Been cultures - bacterial melanian – increasing the crop - phytostimulators

Проблема обеспечения стремительно растущего населения планеты пищевыми ресурсами становится все более актуальной. Это обусловлено не только глобальным ухудшением экологической ситуации (эрозия почв, опустынивание и др), но и негативными последствиями интенсификации сельского хозяйства, что привело к загрязнению окружающей среды и накоплению различных вредных веществ (например, нитратов) в растительной продукции. Возможности повышения урожайности растений с помощью синтетических стимуляторов роста ограничены из-за их дороговизны и низкой растворимости в воде. Усилия исследователей направлены на применение в сельском хозяйстве достижений современной науки - генной инженерии, биотехнологии, молекулярной биологии. Использование таких средств позволит, влияя на определенный этап технологического процесса или звено метаболизма, увеличивать выход продукции с нужными свойствами. И если при этом, кроме основного продукта, получается побочный, также обладающий полезными свойствами, то такой продукт оказывается в центре внимания исследователей.

Таким продуктом оказался полученный в НИИ биотехнологии РА темно-коричневый пигмент, который вырабатывается у нитрозогуанидинового мутантного штамма *Bacillus thuringiensis*. Родительский штамм, давно используемый в производстве инсектицидных препаратов, пигмента не образует. У мутантного же штамма в клетках образуется водорастворимый пигмент, который, выделяясь, окрашивает отход производства - культуральную жидкость (КЖ) в темно-коричневый цвет. Предварительные опыты показали стимулирующее действие КЖ на рост и развитие растений, а исследования физико-химических свойств пигмента позволили отнести его к меланинам бактериального происхождения [11].

Среди природных пигментов меланины занимают особое место, т.к. ими обусловлено цветовое разнообразие живой природы, и интерес к ним постоянно растет благодаря выявлению их новых полезных свойств – антиоксидантных, противовоспалительных, биозащитных, антирадиационных, антитоксических, антиопухолевых и др.[7-9]. Они уже используются в практических целях в ряде отраслей науки и техники, однако из-за дороговизны, сложности выделения и очистки от примесей сфера их применения весьма ограничена.

Влияние меланина - *Btm* (*Bac. thuringiensis melanin*), выделяемого мутантным штаммом *Bac. Thuringiensis*, на рост, развитие и плодообразование ряда культур изучают сотрудники кафедры микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов ЕГУ. Более чем десятилетние исследования физиологической активности *Btm*, проведенные на 43 видах сельскохозяйственных и декоративных культур, выявили его универсальный стимулирующий эффект. Таким образом, мутантный штамм, сохранив инсектицидную активность родительского штамма, одновременно оказался продуцентом эффективного фитостимулятора для многих видов. Для каждого вида определены эффективные концентрации препарата и способы обработки. Наиболее экономичен способ предпосевного замачивания семян, который испытан на многих видах полевых и декоративных культур, относящихся к разным семействам [1-6, 10,12,13]. В данной работе приводятся обобщенные результаты многолетних исследований влияния *Btm* на бобовые растения - фасоль, нут, горох, чечевицу и люцерну.

Роль бобовых культур в рационе человека довольно велика из-за высокого содержания в них витаминов группы В и белков, состоящих из многих незаменимых, не синтезируемых в организме аминокислот. Плоды и семена бобовых широко используются в консервной промышленности, а также в производстве колбасных и кондитерских изделий. В животноводстве же они являются основными поставщиками растительного белка (протеина), от содержания которого в кормах зависят здоровье и продуктивность сельскохозяйственных животных. Протеиновая недостаточность не менее опасна и для человека, приводя к нарушению нормальной жизнедеятельности и даже к гибели. В настоящее время во многих странах мира для восполнения дефицита белка большое внимание уделяется выращиванию из бобовых культур нута и сои, а также амаранта. В Армении из выращиваемых зернобобовых культур основными являются фасоль и нут, несколько меньшие площади занимают горох и чечевица.

Материал и методика. Объектами исследований служили фасоль (кустовая и вьющаяся), горох, нут, чечевица и люцерна. Обработку вели в основном методом предпосевного замачивания семян в разных разведениях КЖ (1:50, 1:100 и 1:150) и концентраций *Btm* течение 24 ч. В настоящее время используется меланин, выделенный из ферментационной жидкости и очищенный от сопутствующих примесей, предоставляемый НИИ биотехнологии РА. Опыты ставили в лаборатории и оранжерее. Измеряли высоту стеблей, определяли число и массу бобов и семян в них, а также степень развития корневых клубеньков. У фасоли определяли также площадь листа третьего яруса. Анатомические исследования проводили на поперечных срезах четвертых междоузлий стеблей фасоли и нута. Срезы окрашивали сафранином и затем заключали в глицерин-желатин. Измерения анатомических элементов, в основном ксилемы, проводили при помощи окуляр-микрометра МОВ - 1-15х.

Результаты и обсуждение. Первые предварительные опыты были проведены на фасоли. Обработку вели методом предпосевного замачивания семян (однократная) и последующего полива почвы (двукратная обработка) КЖ в разведении 1:100. Полив почвы проводили после появления третьего листа через каждые 3 дня всего 5 раз. Оказалось, что такой полив почвы сильнее стимулировал рост растений вследствие периодической активации апикальной меристемы, а также камбия, в результате чего сформировались крупные кусты, в стеблях которых было больше широкопросветных сосудов ксилемы. Очевидно, это обусловлено большей всасывающей поверхностью развитой корневой системы по сравнению с меньшей поверхностью семенной кожуры. Одновременно у растений поливного варианта наблюдалось усиление и продление плодообразования, значительное утолщение стебля. Листовая пластинка разрасталась и приобретала темно-зеленую окраску, что обусловлено повышением количества хлорофилла *a* по сравнению с контролем и вариантом замачивания. Однако в полевых условиях метод полива почвы весьма трудоемок и связан с большим расходом препарата, поэтому в дальнейшем использовали в основном более экономичный метод замачивания семян.

В дальнейших опытах замачивание проводили в КЖ ряда разведений (1:50, 1:100 и 1:150) и *Btm* разных концентраций. Семена проращивали в лаборатории, отмечая сроки прорастания, степень развития корневой системы проростков, затем ростки высаживали в стеллажи в оранжерее. Глубина стеллажей до 25 см, почва при проведении данных опытов была неплодородной, подкормки растениям не давали, чтобы изучить эффект *Btm* в условиях скудного минерального питания. Отмечено ускорение прорастания семян на 2-3 дня при разведении КЖ 1:100, а также усиленный ризогенез. В одном из опытов под влиянием *Btm* как у кустовой, так и у вьющейся фасоли также на два - три дня ускорилось прорастание семян, лучше развивалась корневая система, проростки росли быстрее, сильнее ветвились и зацвели на 7-10 дней раньше контроля. Когда у контроля началось цветение, у обработанных растений уже были сформированы плоды, содержащие на 1-2 крупных семени больше, чем в контроле (рис.1).



Рис.1. Влияние *Btm* на листья и плоды вьющейся фасоли.

У опытных растений фасоли за счет активации маргинальной меристемы разрастается листовая пластинка. Так, площадь листа третьего яруса значительно превосходила контроль - 418,75 см² против 258,75 см², т.е. в 1,6 раза. Поскольку у вьющейся фасоли вегетация длиннее, во всех прежних опытах урожай с 1 куста обработанных и контрольных растений был выше, чем у кустовой фасоли.

Аналогичная стимуляция наблюдалась в тепличном комплексе, построенном по голландскому проекту в г. Чаренцаван, при замачивании семян фасоли (вьющейся и кустовой) в растворе *Btm*, где урожай зеленых бобов (особенно первых сборов) повышался на 28%. Благодаря автоматическому обеспечению растений необходимыми на каждой фазе развития минеральными элементами, многочисленные завязавшиеся плоды не испытывали недостатка в питательных веществах. А шпалерная система выращивания вьющейся фасоли обеспечивала разросшиеся листья необходимыми условиями для интенсивного фотосинтеза. Этот опыт доказал целесообразность использования *Btm* также в подобных теплицах.

Эффект усиливался, если в фазе вегетации растения, например, в полевом опыте на перце, получали дополнительную подкормку птичьим пометом, ибо стимуляция цветения и плодообразования не всегда сочетались с адекватным приростом ассимиляционной массы (табл. 1). Это разведение оказалось более эффективным и для нута, чечевицы и гороха.

Таблица 1. Влияние *Btm* на некоторые показатели растений кустовой фасоли

Показатели (среднее на 1 растение)					
Варианты	Высота стебля, см	Масса, г			
		надземной части	бобов	семян	1000 семян
Контроль	39.4±0.3	88.5±0.2	57.4±0.1	42.7±0.4	343.2±1.5
<i>Btm</i>	48.7±0.2	107.2±0.5	99.2±0.2	56.3±0.5	422.4±1.7

В опыте с нутом оптимальная концентрация *Btm* вызвала формирование большего, чем в контроле, числа двусемянных бобов с многочисленными и более крупными семенами, которые ко времени учета опыта все вызрели. После отмирания контрольных растений опытные более двух недель еще цвели и завязывали бобы. Данные табл. 2 свидетельствуют о значительном превышении изученных показателей растений нута под влиянием *Btm*, что проявилось в усиленном плодообразовании и увеличении числа и массы семян, т.е. в повышении также и семенной продуктивности обработанных растений. Несомненно, что в полевых условиях на высоком агрофоне обработанные растения в большей мере будут превосходить контрольные (табл. 2).

Таблица 2. Влияние *Btm* на некоторые показатели растений нута

Показатели (среднее на 1 куст)	Показатели		
	Контроль	<i>Btm</i>	% к контролю
Высота стебля, см	70,77±1.8	82.15±1.6	116.1
Число боковых ветвей, шт.	4±0.3	6±0.1	150.1
Число семян, шт.	36±1.1	53±0.4	167,6
Число бобов, шт.	38±1.2	57±0.8	150.0
Масса 1000 семян, г	201.7±3.24	224.2±3.67	111.1

Анатомические исследования нижних междоузлий стеблей фасоли, чечевицы, нута показали заметную стимуляцию деятельности не только апикальной меристемы, ответственной за рост стебля, но и камбия. Это проявилось в формировании утолщенных, интенсивно ветвящихся в нижней части стеблей с хорошо развитыми проводящими тканями - ксилемой и флоэмой, что обеспечило водой, минеральными элементами и фотоассимилятами большее число бобов. У растений эффективного варианта период плодоношения был длиннее на 8 -10 дней, в течение которых продолжалось интенсивное цветение и плодообразование, причем в бобах гороха, как и у фасоли было на 1-2 семени больше, чем в контроле. В этом варианте все изученные показатели были выше, чем в контроле. Варианты с более концентрированными растворами по большинству показателей уступали контролю. Урожай с 1 куста здесь был ниже, семена завязались и созрели позже.

Подытоживая влияние *Btm* на рост, строение стебля и плодообразование испытанных бобовых культур, можно констатировать, что *Btm* не только ускоряет прорастание семян, рост проростков, цветение и плодообразование, но и способствует обильному цветению и завязыванию множества бобов с большим числом семян в них (фасоль, горох и нут), одновременно удлиняя вегетацию примерно на две недели.

Подобная стимуляция роста и развития растений может оказаться весьма полезной при выращивании бобовых кормовых трав, тем более что на корм их скашивают в фазе бутонизации - цветения, когда у них наиболее высока кормовая ценность, а следовательно, можно будет получать более высокий урожай богатого витаминами и белками зеленого корма. В наших исследованиях семена люцерны были замочены в *Btm*. Мелкие семена люцерны, несмотря на их малую всасывающую поверхность, проросли раньше контрольных, интенсивно ветвились и быстрее отрастали после укоса. Семена люцерны перед посевом не заражали соответствующим штаммом азотфиксирующих бактерий, и тем не менее при учете опыта через 2 года на корнях опытных растений было значительно больше крупных корневых клубеньков, чем на корнях контрольных растений. Поскольку в этом стеллаже бобовые не выращивались и значит клубеньковых бактерий было мало, что проявилось в формировании немногочисленных и маленьких клубеньков на контрольных растениях, то можно предположить, что более интенсивное и раннее формирование клубеньков на корнях растений, выросших из замоченных в растворе эффективной концентрации *Btm* семян, было обусловлено стимулирующим влиянием *Btm* на деятельность клубеньковых бактерий. Это отразилось и на большем содержании белков (на 1,3 %) в семенах нута этого варианта.

Таким образом, результаты десятилетних исследований позволяют констатировать, что *Btm* обладает четко выраженным стимулирующим эффектом, который проявляется в более раннем и дружном прорастании почти всех замоченных семян, усиленном росте стебля и ветвлении его основания, более раннем начале продолжительного цветения, плодообразовании, увеличении числа и размера семян в бобах, что приводит к повышению урожайности. Одновременно у опытных растений отмечалось усиленное формирование корневых клубеньков, вследствие активации деятельности азотфиксирующих бактерий, что даже при выращивании люцерны в неглубоком стеллаже со скудной почвой обусловило образование большего числа корневых клубеньков у опытных растений. Следует отметить также, что выращенные из обработанных в *Btm* семян растения всех испытанных видов оказались более выносливыми и полностью завершили свой онтогенез, в то время как в контроле часть растений высохла.

Во всех опытах на полевых культурах повышение урожайности сочеталось с потемнением окраски листвы, что обеспечивало снабжение большего числа плодов фотоассимилятами, а разрастание корневой системы - водой и минеральными элементами. Таким образом, замачивание семян бобовых, как и других овощных культур в растворах эффективных (различающихся по видам) концентраций *Btm* способствует оптимизации гормонального баланса, определяющего направленность и интенсивность физиологических, биохимических и анатомических изменений в онтогенезе. Одновременно с активацией меристематической деятельности опытных растений повышается также плодообразование, часто с улучшением биохимических показателей товарной продукции.

Распространение этого экологически безопасного природного стимулятора роста, выделяемого из отхода производства, среди фермеров и в крупных тепличных комплексах позволит поднять продуктивность различных отраслей сельского хозяйства.

Работа выполнена при финансовой поддержке
проекта ANSEF N1270 - NS - biotech.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарян К.Г., Петросян М.Т., Агаджанян Д.А., Попов Ю.Г. Известия ГАУА, 5, с.5-8, 2005.
2. Азарян К.Г., Петросян М.Т., Татевосян Л.М., Овсепян А.С., Аветисова Г.Е., Агаджанян А.Е., Попов Ю.Г. Мат-лы межд. конф. "Успехи биотехнологии: преспективы развития в Армении", с.184, Цахкадзор, 2006.
3. Азарян К.Г., Петросян М.Т., Палазян Т.Н., Гандилян Р.А. Известия ГАУА, № 4, с.5- 8, 2007.
4. Азарян К.Г., Погосян К.С., Гуламирян Р.С., Попов Ю.Г. Виноделие и виноградарство, 1, с. 35-36, 2007.
5. Азарян К.Г., Петросян М.Т., Попов Ю. Г. Сб. мат. межд. науч . конф. "Биология: теория, практика, эксперимент", Саранск, с. 208-210, 2008.
6. Азарян К.Г. Мат-лы 1 Междунар. симпоз. "Армянский абрикос", Ереван, с. 84-87, 2008.
7. Барабой В.А. Укр. биохим. ж., 71(4), с. 5-14, 1999.
8. Барабой В.А. Усп. совр. биол., 121, 1, 1-12, 2001.
9. Борщевская М.И., Васильева С.М. Вопросы мед. химии, 1, с.1-11, 1999.
10. Погосян К.С., Азарян К.Г., Попов Ю.Г. Межд. конф." Методол. аспекты создания прецизионных технологий возделывания плодовых культур и винограда.", 2, с.109-112, Краснодар, 2006.
11. Aghadjanyan A.E et al. Pigment Cell research, 2, p.130-136, 2005.
12. Popov Yu.G., Azaryan K.G., Petrossyan M.T., Martirosyan G.S. Bulletin of Armenian Agric. Academy, 4, p.5-8, 2004.
13. Popov Yu.G., Azaryan K.G., Petrossyan M.T., Agadjanyan J.A., Shcherbakova E.N. Revue of Cytology et Biology vegetales-Le Botaniste, France, 28, p. 252 - 259, 2005.

Поступила 13.06.2008